

INAUGURAL – DISSERTATION

**zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät
der
Ruprecht – Karls – Universität
Heidelberg**

vorgelegt von

Diplom-Biologin Dana Holzinger

aus: Oranienburg

Tag der mündlichen Prüfung:

**Virale und zelluläre Faktoren zur Identifizierung
HPV-assoziierter Oropharynxkarzinome**

Gutachter: Prof. Dr. Lutz Gissmann

Prof. Dr. Valerie Bosch

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde in der Zeit von 05/2008 – 12/2011 im Molekularbiologischen Labor der Hals-Nasen-Ohren Abteilung des Universitätsklinikums und in der Abteilung „Genomveränderungen und Karzinogenese“ (Leiter Prof. Dr. Lutz Gissmann) am Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ) in Heidelberg unter der Anleitung von Dr. Franz X. Bosch und Dr. Michael Pawlita ausgeführt. Die Arbeit wurde zum Großteil über ein Stipendium des Graduiertenkollegs 793 der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG), „Epidemiologie übertragbarer und chronischer, nicht übertragbarer Erkrankungen und deren Wechselwirkungen“, finanziert.

Mein größter Dank gilt beiden Betreuern, Dr. Franz X. Bosch und Dr. Michael Pawlita, für die Aufnahme in ihre Arbeitsgruppen, für die Hilfe bei der Auswahl und Umsetzung dieser Promotionsarbeit und für die hervorragende Betreuung während meiner Promotionszeit.

Danken möchte ich außerdem...

... Prof. Dr. Valerie Bosch und Prof. Dr. Lutz Gissmann für die Begutachtung dieser Arbeit.

... Antje Schuhmann, Ines Kaden, Nataly Henfling und Regina Mark für die großartige Unterstützung zu jeder Zeit und für das freundliche und humorvolle Arbeitsklima. Es war mir stets eine große Freude mit euch zusammenzuarbeiten!

... stellvertretend für das Graduiertenkolleg 793, Prof. Dr. Heiko Becher und Elke Braun-van der Hoeven für das außerordentlich gute Lehrangebot und für die Organisation.

... Dr. Markus Schmitt für seine freundliche Unterstützung, die Bereitstellung der in dieser Arbeit verwendeten Analytik (DNA- und RNA-Assays) und fürs Korrekturlesen.

... Axel Benner für die freundliche Überprüfung der statistischen Analysen.

... Dr. Christa Flechtenmacher und dem OP-Team der HNO-Klinik, insbesondere Dr. Gerhard Dyckhoff, für die Bereitstellung der Oropharynxkarzinome.

... PD Dr. Jochen Heß für die Übernahme in seine Arbeitsgruppe „Experimentelle Kopf-Hals Onkologie“ und für das Projekt ‚Epigenetik‘.

... unserem Kooperationspartner Ernst-Jan Speel, sowie Annick Haesevoets für die Gastfreundschaft und Unterstützung bei der Durchführung der FISH-Experimente in Maastricht/NL.

... allen meinen Kollegen am DKFZ, Gordana Halec, Daniela Höfler, Eva Neuhäuser, Dr. Angelika Michel, Dr. Martina Willhauck-Fleckenstein, Dr. Tim Waterboer, Dr. Kristina Michael, Monika Oppenländer und Ute Koch für die gute Zusammenarbeit.

Mein ganz besonderer Dank gilt letztlich meinem Mann Daniel für sein Verständnis, seine Geduld und Unterstützung während dieser Zeit.

Inhaltsverzeichnis

I. Zusammenfassung.....	9
II. Summary.....	10
1 EINLEITUNG.....	11
1.1 Das humane Papillomvirus (HPV)	11
1.1.1 Genomaufbau, Transkription viraler Gene und Integration	13
1.1.2 HPV16 RNA-Muster.....	16
1.2 Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches.....	17
1.2.1 Ätiologie, Inzidenz, Risikofaktoren.....	17
1.2.2 Heterogenität unter den HPV-assoziierten Kopf-Hals-Tumoren	21
1.2.3 Behandlungsmodalitäten – Status quo.....	22
1.3 Der Zellzyklus	24
1.3.1 Bedeutung des Tumorsuppressorproteins p53	25
1.3.2 Das Retinoblastomprotein (pRb) und Komponenten des pRb-Signalwegs	25
1.3.3 Aktive HPV-Beteiligung im HNSCC und die Auswirkungen auf den Zellzyklus	26
1.4 Probleme bei der Identifizierung von OPSCC mit aktiver HPV16-Beteiligung.....	28
1.5 Ziele der Doktorarbeit	30
2 MATERIAL	31
2.1 Gewebebiopsien	31
2.1.1 Gefriergewebe	31
2.1.2 Paraffingewebe	31
2.2 Verbrauchsmaterialien.....	31
2.3 Chemikalien	32
2.4 Puffer und Lösungen	33
2.4.1 PCR Puffer und Lösungen.....	33
2.4.2 Luminex Puffer.....	33
2.4.3 IHC Puffer und Lösungen	34
2.4.4 Puffer für die Fluoreszenz In-Situ Hybridisierungen	34
2.5 Enzyme.....	35
2.6 Antikörper	35
2.7 Kommerziell erwerbliche Kits.....	35
2.8 Oligonukleotide	36
2.8.1 Multiplex PCR Primer	36
2.8.2 NASBA Primer	37
2.8.3 Oligonukleotidsonden	37
2.8.3.1 <i>Multiplex HPV-Genotypisierung</i>	37
2.8.3.2 <i>NASBA Hybridisierungssonden</i>	38

2.8.4	Fluoreszenz <i>In-Situ</i> Hybridisierung (FISH)	38
2.9	Geräte.....	39
2.10	Computer Software.....	40
3	METHODEN.....	41
3.1	Klinische Datenerhebung und Patientenkollektiv	41
3.2	Gewebeschnitte	41
3.3	HE-Färbung	42
3.4	HPV DNA-Analyse.....	43
3.4.1	DNA Extraktion	43
3.4.2	BSGP5+/6+-PCR/Multiplex HPV-Genotypisierung (MPG).....	43
3.4.2.1	<i>BSGP5+/6+-Polymerase Kettenreaktion</i>	43
3.4.2.2	<i>Beta-Globin PCR – DNA Integritätskontrolle</i>	46
3.4.2.3	<i>MPG-Analyse</i>	46
3.4.2.3.1	Prinzip der Analyse.....	46
3.4.2.3.2	Kopplung der Oligonukleotidsonden an die Beads	46
3.4.2.3.3	Hybridisierung, Detektion, Cut-off Bestimmung und Viruslast.....	47
3.4.3	HPV16 quantitative real-time PCR	48
3.4.3.1	<i>Prinzip der Analyse</i>	48
3.4.3.2	<i>Durchführung</i>	49
3.5	HPV16 RNA Analysen	50
3.5.1	RNA Extraktion	50
3.5.2	NASBA (<i>nucleic acid sequence based amplification</i>) und Hybridisierung	50
3.5.2.1	<i>Prinzip der Analyse</i>	51
3.5.2.2	<i>Durchführung NASBA</i>	51
3.5.2.3	<i>Durchführung Hybridisierung</i>	53
3.5.2.4	<i>Cut-off Bestimmung und Quantifizierung</i>	53
3.5.2.5	<i>Die viralen RNA-Muster</i>	54
3.6	Gewebechiptechnologie	54
3.6.1	Gewebeauswahl und HE-Färbung	55
3.6.2	TMA-Anfertigung.....	55
3.6.3	Schneiden des Gewebechips	56
3.7	Fluoreszenz In-Situ Hybridisierung.....	57
3.7.1	Vorbereitung der Schnitte	57
3.7.2	Vorbereitung der Hybridisierungssonden	58
3.7.3	Denaturierung und Hybridisierung	58
3.7.4	Waschen	58
3.7.5	Detektion der biotinmarkierten DNA-Sonden	59
3.7.6	Einbetten der Präparate.....	59
3.7.7	Auswertung	60

3.8	Immunhistochemie (IHC).....	60
3.8.1	Färben der Schnitte	60
3.8.1.1	<i>ImmPRESS™ Detektionssystem</i>	61
3.8.1.2	<i>TSA™-Detektionssystem</i>	62
3.8.2	Auswertung	63
3.9	Statistische Analysen	65
3.9.1	Korrelationsanalysen	65
3.9.2	Clusteranalysen	66
3.9.3	Überlebensanalysen	66
3.9.3.1	<i>Univariate Analysen des Gesamt- und Progressionsfreien Überlebens</i>	66
3.9.3.2	<i>Multivariate Analysen des Gesamt- und Progressionsfreien Überlebens</i>	67
3.9.4	Assoziationsanalysen	67
3.9.5	Berechnungen von Se, Sp, PPV und NPV	68
4	ERGEBNISSE	69
4.1	Analysen an frisch-gefrorenem Tumormaterial: Virale Marker	69
4.1.1	HPV DNA-Analyse	69
4.1.1.1	<i>HPV DNA-Prävalenz</i>	70
4.1.1.2	<i>Co-Amplifizierung von HPV16 und Beta-Globin</i>	71
4.1.1.3	<i>HPV Viruslast</i>	72
4.1.2	HPV16 mRNA Analyse	74
4.1.2.1	<i>Quantitative HPV16 E6*I und E6*II RNA Analysen</i>	74
4.1.2.2	<i>HPV16 RNA-Muster</i>	77
4.1.2.3	<i>HPV16 RNA-Prävalenz</i>	80
4.1.3	Patienten- und Tumorcharakteristika.....	81
4.1.4	Überlebensanalysen	83
4.1.4.1	<i>Gesamtüberleben (OS)</i>	83
4.1.4.1.1	Univariate Analysen.....	83
4.1.4.1.2	Multivariate Analysen.....	84
4.1.4.2	<i>Progressionsfreies Überleben (PFS)</i>	88
4.1.4.2.1	Univariate Analysen.....	88
4.1.4.2.2	Multivariate Analysen.....	89
4.2	Analysen an Formalin-fixiertem und in Paraffin-eingebettetem Tumormaterial.....	92
4.2.1	Fluoreszenz In-Situ Hybridisierung zur Analyse der Virus-DNA	92
4.2.2	Immunhistochemie zur Analyse zellulärer Proteinmarker	96
4.2.2.1	<i>Proteinexpression und deren Prävalenz in den HPV Gruppen</i>	97
4.2.2.2	<i>Assoziationen zellulärer Proteinmarker und HPV16 RNA-Status</i>	102
4.2.2.3	<i>Überlebensanalysen zellulärer Proteinmarker</i>	104
4.3	Markerkombinationen	109
4.3.1	Viruslast und virale RNA-Muster.....	109
4.3.2	Zelluläre Proteinmarkerkombinationen.....	112

4.3.3	Virus DNA und zelluläre Proteinmarker	115
5	DISKUSSION	118
5.1	Analyse an frisch-gefrorenem Biopsiematerial	119
5.2	Analysen an Formalin-fixiertem und in Paraffin-eingebettetem Material	125
5.2.1	Fluoreszenz In-Situ Hybridisierung im Vergleich zur PCR und zur Viruslast	125
5.2.2	Zelluläre Proteinmarker	127
5.2.2.1	<i>p16^{INK4a} als Marker für OPSCC mit aktiver HPV-Beteiligung</i>	127
5.2.2.2	<i>pRb als Marker für OPSCC mit aktiver HPV-Beteiligung</i>	130
5.2.2.3	<i>Cyclin D1 als Marker für OPSCC mit aktiver HPV-Beteiligung</i>	131
5.2.2.4	<i>p53 als Marker für OPSCC mit aktiver HPV-Beteiligung</i>	132
5.2.3	Proteinkombinationen	134
5.3	Kombination zellulärer Proteinmarker und HPV16 DNA-Status	137
5.4	Ausblick	139
6	EIGENE PUBLIKATIONEN	141
6.1	Publizierte Artikel	141
6.2	Eingereichte Artikel oder Artikel in Bearbeitung	141
7	PATENTANMELDUNG	141
8	ABKÜRZUNGEN	142
9	ANHANG	146
10	LITERATURVERZEICHNIS	162

I. ZUSAMMENFASSUNG

Bestimmte onkogene Typen der humanen Papillomviren (HPV), v. a. der häufigste HPV-Typ 16, sowie potentiell andere weniger prävalente ‚Hochrisiko‘-HPV-Typen sind kausal mit einer Untergruppe von Kopf-Hals Tumoren (HNSCC) assoziiert. Unter den HNSCC erscheinen insbesondere die HPV16-positiven Karzinome des Oropharynx (OPSCC) heterogen hinsichtlich der Viruslast, der onkogenen Virusaktivität und dem klinischen Verhalten.

In der vorliegenden Promotionsarbeit wurde die Assoziation viraler und zellulärer Marker und der aktiven HPV-Beteiligung beim OPSCC analysiert. Die Analysen beruhten auf den Markern HPV16 DNA, Viruslast, onkogene RNA (E6*II und E6*I Transkripte), virale RNA-Muster und den zellulären Proteinen p16^{INK4a}, pRb, Cyclin D1 und p53. Des Weiteren wurden die Marker in Zusammenhang mit klinischen Parametern und dem Überleben der Patienten ausgewertet, um so diejenigen Marker zu definieren, die das höchste diagnostische und prognostische Potential aufwiesen, Tumoren mit aktiver HPV-Beteiligung zu identifizieren.

Zunächst wurden 199 frisch-gefrorene OPSCC auf HPV DNA mittels BSGP5+/6+-PCR/Multiplex HPV Genotypisierung analysiert und anschließend die HPV16 Viruslast mittels HPV16 *real-time* PCR quantifiziert. Die gespleißten HPV16 Transkripte E6*II und E6*I (226^526) für die Analyse der onkogenen RNA und die Transkripte E1C (880^2582), E1^E4 (880^3358) und L1 (3632^5639) für die Analyse der viralen RNA-Muster wurden durch einen NASBA/Luminex Assay detektiert. Die zellulären Proteine wurden mittels Immunhistochemie an Gewebechips analysiert, die von 188 Formalin-fixierten und in Paraffin-eingebetteten (FFPE) derselben OPSCC generiert wurden.

Die HPV16-Prävalenz (HPV⁺) betrug insgesamt 49% (97/199). 33/97 (34%) hatten eine hohe (HPV_{high}) und 64/97 (66%) OPSCC hatten eine niedrige (HPV_{low}) Viruslast. Bei 32/33 (97%) HPV_{high} und auch bei 16/64 (25%) HPV_{low} Tumoren waren die onkogenen RNA-Transkripte vorhanden (RNA⁺). Die viralen RNA-Muster (RNA⁺/CxCa⁺) wurden bei 31/33 (94%) HPV_{high} und bei 40/48 (83%) RNA⁺ Tumoren nachgewiesen. Demzufolge lag die Prävalenz von aktivem HPV16 (RNA⁺/CxCa⁺) in dieser OPSCC Kohorte bei nur 20% (40/196).

Die zellulären Proteinexpressions-Muster der RNA⁺/CxCa⁺ OPSCC unterschieden sich signifikant von den HPV⁻ und den RNA⁻ Tumoren. RNA⁺/CxCa⁺ war assoziiert mit hohen p16^{INK4a}- und niedrigen pRb-, Cyclin D1- und p53-Expressionsleveln. Nur 31/39 (80%) RNA⁺/CxCa⁺, aber auch 23/137 (17%) HPV⁻ oder RNA⁻ Tumoren überexprimierten p16^{INK4a}. Die stärkste Assoziation für RNA⁺/CxCa⁺ (OR=59,1; 95%KI=15,3-228,8; p<0,0001) und die besten prädiktiven Werte (Sensitivität 79%, Spezifität 94%, PPV 79%, NPV 94%) wurden für die Kombination von hohen p16^{INK4a}- und niedrigen pRb-Expressionsleveln gefunden.

Von allen untersuchten viralen und zellulären Markern oder Markerkombinationen, zeigte RNA⁺/CxCa⁺ die höchste Sensitivität und gleichzeitig das geringste Risiko am OPSCC zu versterben (HR=0,31; 95%KI=0,14–0,68; p=0,01) und wurde daher als bester Marker für die Identifizierung der OPSCC mit aktiver HPV-Beteiligung vorgeschlagen.

Die klinische Heterogenität unter den HPV16 DNA-positiven OPSCC kann durch die umfangreiche Bestimmung der Viruslast und der Expression der viralen RNA-Muster aufgedeckt werden. Dagegen sollte die Verwendung von zellulären Surrogatmarkern beim OPSCC nicht allein auf der Expression von p16^{INK4a} basieren. Sofern nur FFPE-Material zur Verfügung steht, ist die Markerkombination p16^{INK4a}-hoch/pRb-niedrig, auch in Verbindung mit dem HPV16 DNA-Status, bestens geeignet, einen RNA⁺/CxCa⁺ Tumor mit biologisch aktivem HPV16 zu identifizieren, der eindeutig eine eigene OPSCC-Entität mit einem besserem Überleben darstellt.

II. SUMMARY

Specific oncogenic types of human papillomaviruses (HPV), most frequently HPV-type 16 and potentially also other less prevalent high-risk HPV types, are causally associated with a subset of head and neck squamous cell carcinomas (HNSCC). HNSCC and more specifically oropharyngeal squamous cell carcinomas (OPSCC) containing HPV16 DNA appear heterogeneous regarding viral load, oncogenic activity and clinical behavior.

In the present thesis, the association of viral and of cellular markers with transcriptionally active HPV16 in OPSCC was analyzed. Analyses of the markers consisted of HPV16 DNA, viral load, oncogenic RNA (E6*II and E6*I transcripts), viral RNA patterns and cellular proteins p16^{INK4a}, pRb, Cyclin D1 and p53. The markers were further evaluated with clinical parameters and patients' survival to define the markers with best diagnostic and prognostic significance for the identification of OPSCC with active HPV involvement.

199 fresh-frozen OPSCC were initially analyzed for HPV DNA by BSGP5+/6+-PCR/Multiplex HPV Genotyping and HPV16 DNA was further quantitated by real-time PCR. HPV16 spliced transcripts E6*II and E6*I (226^526) for the analysis of oncogenic RNA and transcripts E1C (880^2582), E1^E4 (880^3358) and L1 (3632^5639) for the analysis of viral RNA patterns were detected by a NASBA/Luminex assay. The expression of the cellular proteins was analyzed by immunohistochemistry on tissue microarrays created from 188 formalin-fixed and paraffin-embedded (FFPE) OPSCC.

Overall, HPV16 prevalence (HPV⁺) was 49% (97/199). Viral load was high (HPV_{high}) in 33/97 (34%) and low (HPV_{low}) in 64/97 (66%) OPSCCs. Viral oncogene RNA was present (RNA⁺) in 32/33 (97%) HPV_{high} tumors, but also in 16/64 (25%) HPV_{low} tumors. Viral RNA patterns as seen in cervical carcinomas were present (RNA⁺/CxCa⁺) in 31/33 (94%) HPV_{high} tumors, and in 40/48 (83%) RNA⁺ tumors. Thus, prevalence of active HPV16 (RNA⁺/CxCa⁺) in this OPSCC cohort was only 20% (40/196).

The cellular protein expression profiles of RNA⁺/CxCa⁺ OPSCCs were significantly different from both, HPV⁻ and RNA⁻ tumors. RNA⁺/CxCa⁺ was associated with high p16^{INK4a} and with low pRb, Cyclin D1 and p53 expression levels. Only 31/39 (80%) RNA⁺/CxCa⁺ tumors, but also 23/137 (17%) HPV⁻ or RNA⁻ tumors overexpressed p16^{INK4a}. The strongest associations with RNA⁺/CxCa⁺ tumors (OR=59.1, 95%CI=15.3-228.8, p<0.0001) and best predictive values (79% sensitivity, 94% specificity, 79% PPV, 94% NPV) were found for the combination of high p16^{INK4a} and low pRb expression levels.

By uni- and multivariate statistical analysis, RNA⁺/CxCa⁺ conferred the best sensitivity and also the lowest risk of death from oropharyngeal cancer (HR=0.31, 95%CI=0.14–0.68, p=0.01) of all viral and cellular markers or marker combinations and was therefore suggested to be best marker for the identification of OPSCC with active HPV involvement.

Thus, the clinical heterogeneity of HPV16 DNA-positive OPSCC can be overcome by comprehensive determination of viral load and expression of viral RNA patterns. The use of cellular surrogate markers should not rely on expression of p16^{INK4a} alone in head and neck cancer. If only FFPE biopsy material is available, the marker combination p16^{INK4a}-high/pRb-low and also in addition to HPV16 DNA status is best suited to predict and to identify RNA⁺/CxCa⁺ OPSCC with biologically active HPV16 which represent a distinct OPSCC entity with improved prognosis.

1 EINLEITUNG

1.1 Das humane Papillomvirus (HPV)

Bei den humanen Papillomviren handelt es sich um kleine, unbehüllte, epitheliotrope Viren, d. h. sie infizieren Epithelzellen. Das Virus besitzt ein doppelsträngiges DNA-Genom, sein Kapsid ist ikosaedrisch aufgebaut und hat einen Durchmesser von 52-55 nm (Abb. 1-1).

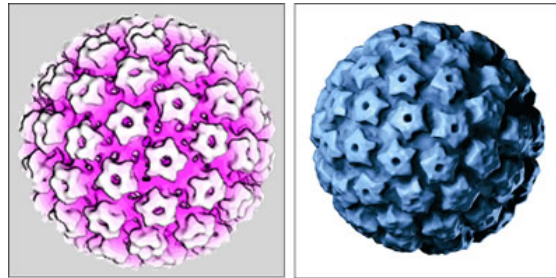


Abb. 1-1 Darstellung des humanen Papillomvirus.

Quelle: <http://cervixcentrum.charite.de/3hr/33forschgruppe.html>

Es wurden mittlerweile über 100 Typen der Gattung identifiziert, von denen ungefähr die Hälfte bei der Ätiologie von Malignomen, vor allem im Genitalbereich (z. B. das Zervixkarzinom) involviert ist. Andere Typen sind bei der Ausbildung von benignen Tumoren wie Warzen oder Papillomen beteiligt. Auf dieser Grundlagen wurde die Nomenklatur der Niedrig- („low-risk“-HPV) und Hochrisiko-HPV-Typen („high-risk“-HPV) generiert. Das Virus vermag entweder die Basalzellschicht der Haut (kutane- bzw. Haut-HPV-Typen) oder die der Schleimhaut (mukosale- bzw. Genital-HPV-Typen) zu infizieren. Mukosale HPV-Typen werden häufig sexuell übertragen. Das Risiko einer Infektion mit den sexuell übertragbaren Viren korreliert mit der Anzahl an Sexualpartnern, zusätzlich spielt Rauchen und die Einnahme oraler Kontrazeptiva eine Rolle (1, 2).

Der Eintritt des Virus in die Zelle und somit die Infektion erfolgt über kleinste Verletzungen der obersten Epithelschichten. Von dort breitet sich das Virus schließlich bis in die tiefer gelegene Basalzellschicht aus (schematisch in Abbildung 1-2 dargestellt). In den Basalzellen, die zu einem Teil als Stammzellen eines Epithels fungieren, etabliert sich das Virus letztlich; die Virus-DNA liegt hier zunächst episomal in geringer Kopienzahl vor. Teilt sich eine infizierte Basalzelle, so gibt sie die Virus DNA an ihre Tochterzellen weiter. Eine Tochterzelle wandert danach in die äußere Schicht des Epithels, während die andere Tochterzelle in der Basalschicht verbleibt und durch weitere Zellteilungen ihrerseits infizierte Epithelzellen hervorbringen kann. Im Allgemeinen handelt es sich bei Keratinozyten der äußeren Epithelschicht um ausdifferenzierte Zellen, das heißt sie befinden sich in der G0-Phase und es erfolgen somit keine weiteren Zellteilungen. Die Expression der frühen E6 und

E7 Virus-Onkogene führt jedoch in der infizierten Zelle zu einem Übertritt der G1- in die S-Phase des Zellzyklus und die Zelle erhält somit ihre proliferative Aktivität bei; der Eintritt in die G0-Phase bleibt damit aus. In der infizierten Tochterzelle, die zur äußeren Epithelschicht wandert, erfolgt die Replikation von tausenden Kopien des viralen Genoms. Das Virus hat es somit durch die Etablierung in der Basalzellschicht geschafft, dort stets neue infizierte Tochterzellen hervorzubringen, die ihrerseits durch die Proliferationsaktivität ebenso infizierte Zellen generieren, sowie das Virus-Genom stark replizieren können (3).

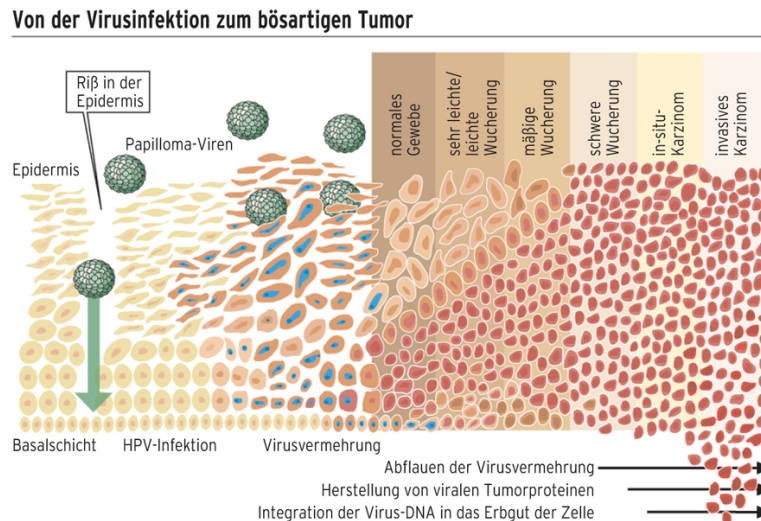


Abb. 1-2 Schematische Darstellung einer Infektion mit HPV vom ‚Hochrisiko‘-Typ und der Progression zum Zervixkarzinom.

Quelle: www.krebsgesellschaft.de/download/hpv-inf.pdf; modifiziert nach (4).

Eine kausale Assoziation zwischen den mukosalen HPV-Typen, vor allem HPV16 und HPV18, und Karzinomen der Cervix Uteri (Zervixkarzinom) gilt für 99% der Tumoren als gesichert (5). Das Virus-Genom wurde bei diesen Tumoren wiederholt ins Wirtsgenom integriert vorgefunden (6-8). Eine Infektion mit den onkogenen Hochrisiko-HPV-Typen, vor allem HPV16, spielt außerdem bei der Entstehung von Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals Region, vor allem des Oropharynx, eine Rolle. Es werden mehr und mehr Parallelen zur Karzinogenese des Zervixkarzinoms nachgewiesen. Jedoch gibt es auch wenige inkonsistente Eigenschaften.

Im Gegensatz zum Epithel der Cervix Uteri, zeichnet sich das Epithel der Tonsillen im Oropharynx durch so genannte Krypten aus. Diese Krypten dienen der Oberflächenvergrößerung des Tonsillenepithels und ragen bis in das lymphoide Gewebe der Tonsillen hinein (Abbildung 1-3a). Dies hat den Vorteil, dass pathogene Fremdkörper, die über den Mund in den Rachen gelangen, auf einfache Weise unschädlich gemacht werden können. Die Basalzellschicht ist an dieser Stelle nicht vollständig und die darunter liegende Basalmembran ist porös, so dass die direkte Passage der Lymphozyten und der Antigen-Präsentierenden Zellen ermöglicht ist. In der intermediären Zellschicht befinden sich in

dieser Region ebenfalls Lymphozyten und Antigen-Präsentierende Zellen; die oberste Zellschicht des Epithels in der Region ist dünn und fragil. Im Bereich der Krypten ist somit der Kontakt zwischen dem lymphoiden Gewebe der Tonsillen und den äußeren Pathogenen hergestellt (Abbildung 1-3b). Man nimmt heute an, dass eben diese Region für die Infektion mit mukosalen HPV-Typen perfekt zu sein scheint. Im Gegensatz zur Infektion der Cervix Uteri, sind Mikroläsionen des Tonsilleneithels nicht notwendig; das Virus gelangt durch die Tonsillenkrypten direkt zur Basalzellschicht (Abbildung 1-3b). Die folgenden molekularen Schritte während der HPV-Infektion in der Basalzellschicht des Tonsilleneithels sind jedoch weiterhin unklar.

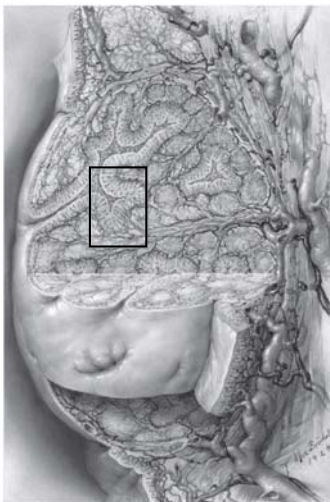


Abb. 1-3a Skizze einer humanen Gaumenmandel (*Tonsilla palatina*). Die Tonsillenkrypten ragen bis in das lymphoide Gewebe hinein (Markierung).
Abbildungen modifiziert nach (9).

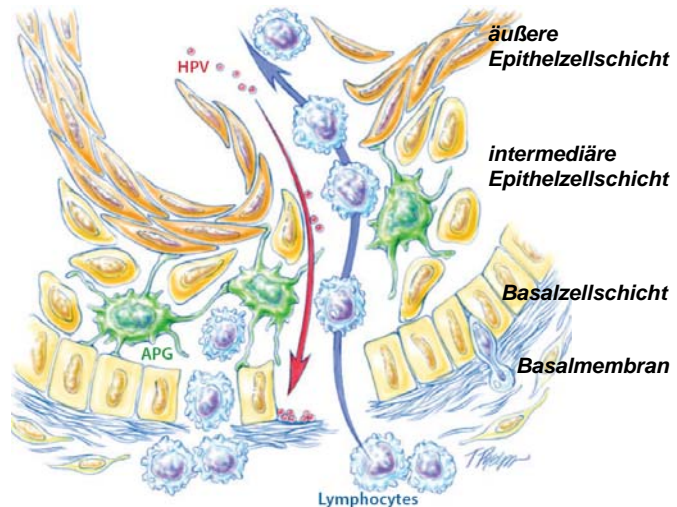


Abb. 1-3b Skizze des Infektionswegs von HPV16 in der Tonsille über die Krypte. Die Tonsillenkrypte ist durch eine poröse Basalmembran und eine darüberliegende unvollständige Basalzellschicht charakterisiert. Auf diese Weise wird eine direkte Passage für die Zellen des Immunsystems möglich.

1.1.1 Genomaufbau, Transkription viraler Gene und Integration in das Wirtszellgenom

Die Papillomviren gehören zu den Viren mit doppelsträngigem DNA-Genom. Es ist zirkulär aufgebaut und besteht aus ungefähr 7900 Basenpaaren (bp), zusätzlich wird es durch Histone komprimiert. Das Genom (Abbildung 1-4) ist in drei funktionelle Bereiche untergliedert; die acht offenen Leseraster (open reading frame, ORF) befinden sich dabei alle auf einem Strang: (i) Der Bereich, der die frühen Virusproteine E1-E7 (early (E) region) kodiert, (ii) der Bereich, der die späten Strukturproteine L1 und L2 (late (L) region) kodiert und (iii) ein nicht-kodierender Bereich, der als Long Control Region (LCR) bezeichnet wird und vor allem für die Regulation der DNA Replikation und Transkription von Bedeutung ist.

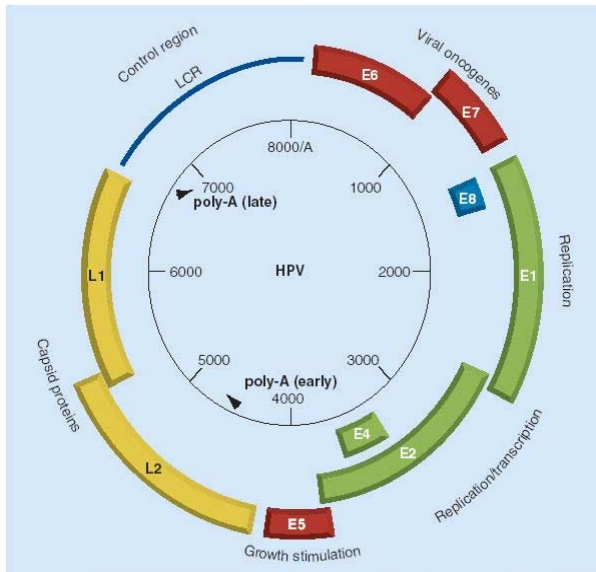


Abb. 1-4 Genomorganisation von HPV16.

Abbildung aus (10).

Zu den frühen Proteinen der E-Region gehören die Virusproteine E1, E2, E4, E5, E6 und E7. Die Funktionen und Eigenschaften der frühen Proteine werden im Folgenden wenn nicht anders angezeigt für den HR-HPV-Typ 16 beschrieben.

Das E1 Protein ist vor allem für die Replikation der Virus-DNA erforderlich. Das Protein bildet Hexamere aus, die anschließend mit Hilfe des E2 Proteins an spezifische DNA Sequenzen (E1 binding site, E1BS) im Replikationsursprung (origin of replication, ORI) binden (11). Der

hexamere Komplex besitzt zwei für die Replikation wesentliche Eigenschaften, eine Helikase-Funktion und eine ATPase-Aktivität (12).

Das E2 Protein bildet Homodimere aus und bindet so an 12-Basenpaar lange palindromische DNA-Sequenzen (E2BS) der LCR (13). Das Protein ist durch seine Fähigkeit der Interaktion mit E1 vor allem wichtig für die Regulation der viralen Transkription und Replikation. Es kann sowohl als Repressor als auch als Aktivator der Transkription fungieren. Bei einer hohen E2-Proteinkonzentration wird die Transkription des Virusgenoms unterdrückt, da durch die Bindung der Homodimere an die E2BS-Sequenz der DNA die Bindung der TATA-Bindeproteine (TBP) an die TATA-Box sterisch verhindert wird ((14), für HPV18).

Das E4 Protein wird verglichen mit den anderen frühen Virusproteinen erst spät transkribiert und ist das in höchster Anzahl produzierte Protein im Lebenszyklus von HPV. Die E4 DNA-Sequenz überlappt mit der E2-Sequenz, wird jedoch von einem anderen Leseraster transkribiert. Bei dem Genprodukt handelt es sich um ein Fusionsprotein ($E1^E4$), das in den differenzierten Zellen der äußeren Epithelschichten exprimiert wird und dort mit Intermediärfilamenten des Zytoskeletts, den Cytokeratinen, interagiert (15, 16). Man nimmt an, dass es bei der Viruszusammensetzung und -freisetzung eine Rolle spielt.

Von dem E5-Leseraster wird ein hydrophobes Protein synthetisiert, das sowohl in intrazellulären Membranen wie auch in der Plasmamembran infizierter Zellen gefunden wird. Das Protein scheint eine wichtige Schlüsselrolle während der Infektion zu spielen, da es mit Wachstumsrezeptoren, wie dem EGF- oder dem PDGF-Rezeptor wechselwirken kann und

die Zelle auf diesem Weg über eine Signalkaskade zur Proliferation veranlasst (17). In 24% der Zervixkarzinome wurde eine Deletion des Gens im Zuge der Integration des viralen Genoms in das Wirtsgenom nachgewiesen (18), daher scheint dieses Protein für die späteren Mechanismen in der Karzinogenese nicht mehr notwendig zu sein.

Durch die Funktion des E6 Proteins wird die Zellproliferation sowie die Inhibierung der Apoptose begünstigt. E6 rekrutiert die zelluläre Protein-Ligase E6-AP und fördert dadurch die Degradation des Tumorsuppressorproteins p53 (19, 20). Durch die drastisch reduzierte Halbwertszeit von p53 wird die Apoptose inhibiert. Außerdem bindet E6 andere zelluläre Proteine, Transkriptions-Coaktivatoren, wie z.B. p300 (21, 22) oder c-myc (23), ferner Proteine, die für die Zellpolarität und Motilität notwendig sind, sowie DNA Replikations- und Reparaturproteine. Das Protein induziert die Expression der Telomerase und begünstigt somit die Telomeraseaktivität (24-27), die wesentlich an der Immortalisierung der Zelle beteiligt ist.

Das E7 Protein stellt die Hauptursache für das transformierende Potential bestimmter Hochrisiko-HPV-Typen dar. Das Protein ist in der Lage mit dem zellulären Retinoblastomprotein (pRb) zu interagieren (28, 29), was zur Freisetzung des S-Phase induzierenden zellulären Transkriptionsfaktors (E2F) und damit zur erhöhten Proliferation der Wirtszelle führt (30). Zusätzlich vermindert E7 die Funktionen der Inhibitoren von Cyclin-abhängigen Kinasen, wie p21^{cip1} und p27^{kip1} (31-33) und es aktiviert die S-Phase Gene für Cyclin A und E (34). Das Protein hat zudem die Fähigkeit Zentrosomen zu destabilisieren, wodurch mitotische Defekte und genomische Instabilität begünstigt werden (35, 36).

Zu den späten Proteinen der L-Region werden die Kapsidproteine L1 und L2 gezählt. L1 und L2 assemblieren zusammen zu Kapsomeren und letztendlich zum ikosaedrischen Kapsid. Die Proteine werden hauptsächlich in den äußeren Epithelzellschichten exprimiert. L1 stellt das Haupt-Strukturprotein bei HPV dar, L2 kodiert dagegen für das Neben-Kapsidprotein. Während L1 die Fähigkeit besitzt mit L2, sowie mit zellulären Rezeptoren zu interagieren, hat L2 die Fähigkeit mit viraler DNA in Interaktion zu treten (37).

Die Regulation der Genexpression von HPV Genomen ist von verschiedenen Faktoren abhängig. So spielen zelluläre und virale Transkriptionsfaktoren, verschiedene Promotoren, differentielles Spleißen oder unterschiedliche Terminationssignale, sowie die posttranskriptionale Stabilität verschiedener viraler mRNAs eine Rolle.

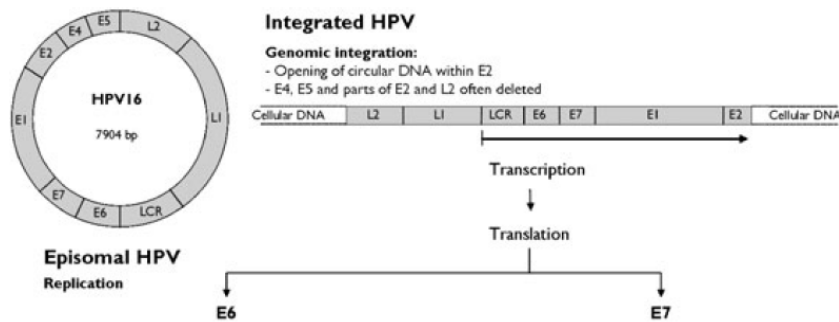


Abb. 1-5 Schema der Integration des HPV16 Genoms ins Wirtszellgenom.
Abbildung aus (38).

Ein häufiger und wichtiger molekularer Event bei der HPV-induzierten Karzinogenese von Zervixkarzinomen ist die Integration des Virusgenoms in das Wirtszellgenom. Dieser Event hat zwei grundlegende Konsequenzen, (i) die selektive Hochregulation der viralen Onkogene E6 und E7 und (ii) einen selektiven Wachstumsvorteil der Zellen mit integrierten Virusgenomen gegenüber Zellen mit episomalen Virusgenomen. Die Konsequenzen der Integration beruhen häufig auf einer Öffnung des Ring-Moleküls in der E2-ORF Region und einer anschließenden Deletion benachbarter Regionen von E2, z. B. E4, E5 und teilweise L2 (Abbildung 1-5). Ob die zelluläre Expression nach der Integration relevant beeinträchtigt oder verändert wird, ist bislang unklar.

1.1.2 HPV16 RNA-Muster

Um die Diagnostik von HPV16-assoziierten Zervixkarzinomen zu verbessern, wurden in der Arbeit von Schmitt *et al.* (39) quantitative HPV16 Transkriptom-Analysen entwickelt und angewandt, um zwischen normalem Epithel oder niedriggradigen Läsionen (*low-grade squamous intraepithelial lesion*, LSIL) und hochgradigen Läsionen (*high-grade squamous intraepithelial lesion*, HSIL) oder Zervixkarzinomen (*cervical carcinoma*, CxCa) unterscheiden zu können. In der Arbeit wurden zwei spezifische HPV16 RNA-Muster identifiziert, die für die Differenzierung zwischen LSIL und HSIL/CxCa von großer Bedeutung sind: (i) hochreguliertes E6*II (226[^]526) bei gleichzeitig niedriger oder abwesender Expression des E1[^]E4 (880[^]3358) Transkripts (im Folgenden als ‚Muster-1‘ bezeichnet) und (ii) hochreguliertes E1C (880[^]2582) bei gleichzeitig niedriger oder abwesender Expression des L1 (3632[^]5639) Transkripts (im Folgenden als ‚Muster-2‘ bezeichnet). Zusätzlich war davon auszugehen, dass das Muster-1 den physikalischen Status des HPV16 Genoms anzeigen kann: In Zellen positiv für Muster-1 liegt das Virusgenom höchstwahrscheinlich in integrierter Form vor, da beim Vorgang der Integration die Splice Stelle von E1[^]E4 sehr häufig deletiert wird (siehe auch Abbildung 1-5) und somit das Gen nicht mehr transkribiert werden kann. Dagegen ist die Funktion von E1C, ein HPV16 Transkript des Musters-2, weiterhin unklar; es

scheint jedoch unabhängig von der Integration des Virusgenoms ins Wirtszellgenom die Hochregulation der Onkogene E6 und E7 zu begünstigen (40).

Verglichen mit den Zervixkarzinomen ist für HPV-positive Kopf-Hals Tumoren ein niedrigerer und inkonsistenter Prozentsatz von 0-41% an HPV DNA-Integration beschrieben (41-43). Ob HPV-positive Kopf-Hals Tumoren die oben beschriebenen viralen RNA-Muster exprimieren, wird in der vorliegenden Arbeit zum ersten Mal untersucht.

1.2 Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals-Bereiches

1.2.1 Ätiologie, Inzidenz, Risikofaktoren

Die Kopf-Hals Tumoren stellen einen Überbegriff für eine Vielzahl von Tumoren des oberen Atem- und Verdauungstrakts dar, der anatomisch die Lippen, Mundhöhle, Nasenhaupt- und -nebenhöhlen, den Rachen (Pharynx) und den Kehlkopf (Larynx) eingrenzt. Histologisch handelt es sich bei den Kopf-Hals Tumoren bei ca. 90% um Plattenepithelkarzinome (*head and neck squamous cell carcinoma*, HNSCC), seltener um Adenokarzinome oder Sarkome. HNSCC sind prognostisch für den Patienten sehr ungünstig, da sie sich häufig schon früh in den Halslymphknoten als Metastasen manifestieren. Manchmal erfolgt die Erstdiagnose einzig auf dem Vorhandensein von regionalen Lymphknotenmetastasen, der Primärtumor wird nicht gefunden. Diese Diagnose wird als CUP-Syndrom (*carcinoma of unknown primary*, CUP) bezeichnet.

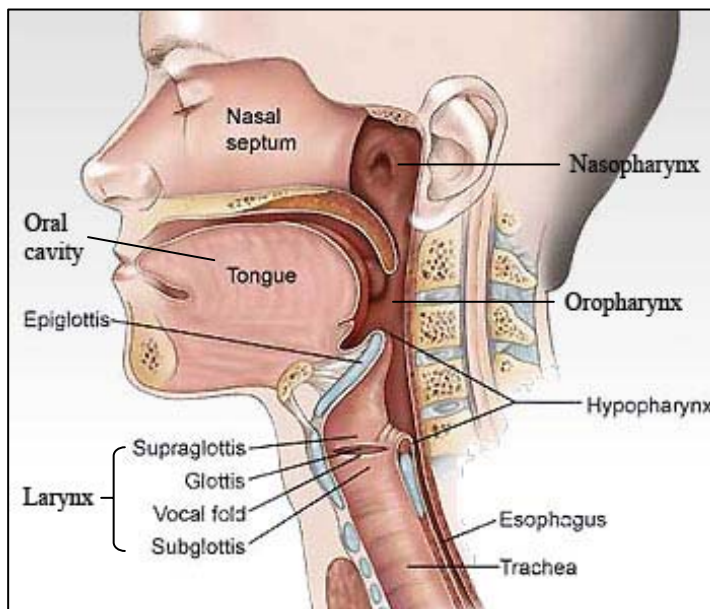


Abb. 1-6 Anatomie der Kopf-Hals Region.

Oral cavity, Mundhöhle; Tongue, Zunge; Larynx, Kehlkopf; Nasopharynx, Nasenrachenraum; Oropharynx, der Mundhöhle angrenzender Rachenraum; Hypopharynx, unterer Rachenraum.

Abb. modifiziert nach www.medicexchange.com/images/stories/anatomy.

Die Kopf-Hals-Region ist in fünf unterschiedliche Lokalisationen (Mundhöhle, Nasopharynx, Oropharynx, Hypopharynx und Larynx) untergliedert (Abbildung 1-6).

In Bezug auf die Tumorlokalisation gehören die Zunge, sowie der Mundboden, das Zahnfleisch, der innere Teil der Lippen und der harte Gaumen zur Mundhöhle.

Der Teil, der die Nasenhaupthöhlen und die Eustachi-Röhren mit dem oberen Teil des Rachens verbindet, wird als Nasopharynx bezeichnet.

Der Oropharynx stellt den Bereich des Rachens dar, der der Mundhöhle angrenzt. Ihm werden die Tonsillen, der weiche Gaumen inklusive des Gaumenzäpfchens (Uvula), sowie der Zungengrund zugeordnet.

Der Hypopharynx stellt den unteren Teil (*hypo*-, griechisch unter) des Rachens dar, der die Rachenhinterwand, den Sinus piriformis und die Postkrikoidregion einschließt. Unter den Rachentumoren haben Patienten mit Hypopharynxkarzinomen die schlechteste Prognose, da sie meist erst in weit fortgeschrittenen Tumorstadien diagnostiziert werden und außerdem durch eine frühe Metastasierung aufgrund des ausgedehnten lymphatischen Gewebes in dem Teil des Rachens charakterisiert sind.

Ventral des Halses ist der Larynx lokalisiert. Er stellt als Teil des Atemtrakts die Verbindung vom Pharynx zur Luftröhre (Trachea) dar. Er umfasst die Stimmbänder und -lippen, sowie die Teile oberhalb (supra-) und unterhalb der Stimmbänder (subglottisch).

Der Kehldeckel (Epiglottis) ist eine mit Schleimhaut überzogene Knorpelplatte und liegt dorsal des Zungengrunds über dem Eingang des Larynx. Seine zum Rachen gewandte Seite gehört anatomisch zur Lokalisation des Hypopharynx, während seine Gegenseite dem Larynx angehört.

Zu den Symptomen von HNSCC gehören chronische Halsschmerzen, sowie Heiserkeit, Ohrenschmerzen, Schwierigkeiten beim Schlucken oder eine Umfangsvermehrung in der Halsregion aufgrund von vergrößerten Lymphknoten.

Kopf-Hals Tumoren gehören zu den sechsthäufigsten Tumorentitäten weltweit (44-48). Ihre Inzidenz variiert stark und ist am höchsten in Regionen mit hohem Tabak- und Alkoholkonsum (49). Hinsichtlich der bösartigen Neubildungen des Pharynx (hier von der *International Agency for Research on Cancer* (IARC) als Kategorie ‚other pharynx‘ klassifiziert, die die Tumoren der ICD10-Codes C09-10 und C12-14 einschließt, s. Abbildung 1-7) wurden für das Jahr 2008 die höchsten Neuerkrankungsraten weltweit für die Länder La Reunion (Frankreich, altersstandardisierte Inzidenzrate, ASR= 8,79), Ungarn (ASR=8,60), Luxemburg (ASR=6,60), Frankreich (ASR=5,37) und Indien (ASR=4,98) berechnet. Deutschland liegt bei diesem Ranking auf Platz 159/184 mit einer ASR von 3,43. Für die USA wurde eine Inzidenzrate von 2,29 bestimmt und liegt damit auf Platz 134 (47). Abbildung 1-7 gibt eine Übersicht der Inzidenzraten weltweit für die bösartigen Neubildungen des Pharynx wieder.

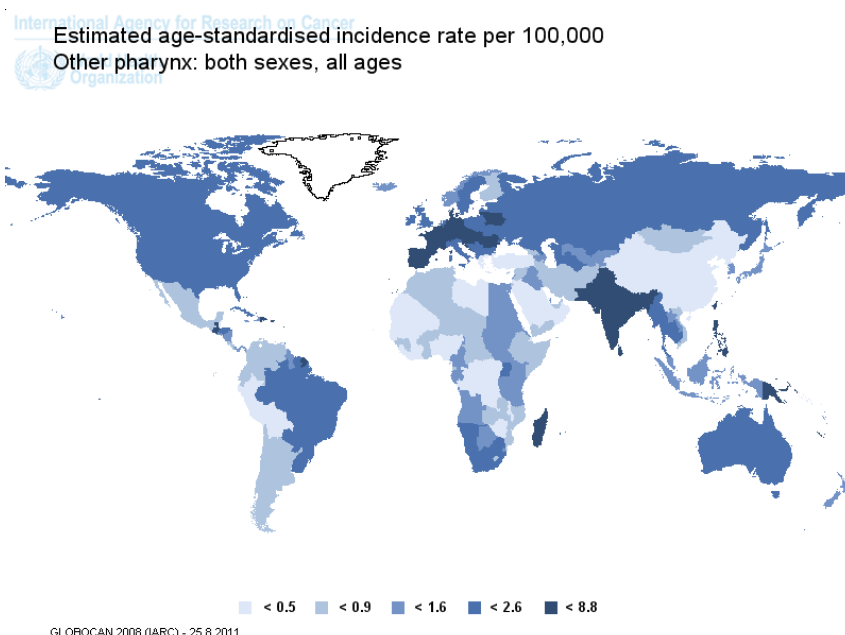


Abb. 1-7 Altersstandardisierte Inzidenzraten bösartiger Neubildungen des Pharynx, weltweit für beide Geschlechter. Eingeschlossen sind Tumoren der Tonsillen (ICD-C09), des Oropharynx (ICD-C10), des Sinus piriformis (ICD-C12), des Hypopharynx (ICD-C13) und Tumoren mit ungenauer Lokalisation (Lippe, Mundhöhle, Pharynx; ICD-C14).
 Abbildung gestaltet nach GLOBOCAN 2008; Cancer Incidence and Mortality Worldwide in 2008 (47).

Betrachtet man die Inzidenzraten unter den Männern der westeuropäischen Länder, so ist die Inzidenz der Tumoren des Pharynx im Jahr 2008 am höchsten in Luxemburg (ASR=12,7), gefolgt von Frankreich (ASR=9,4), Belgien (ASR=6,6) und Deutschland (ASR=5,8; Abbildung 1-8). Frauen sind wesentlich seltener betroffen, am häufigsten in Frankreich (ASR=1,7), gefolgt von Belgien (ASR=1,6), Deutschland, Österreich und den Niederlanden (ASR jeweils 1,1). Analog zu den Inzidenzraten verhalten sich die Mortalitätsraten unter den Geschlechtern (Abbildung 1-8).

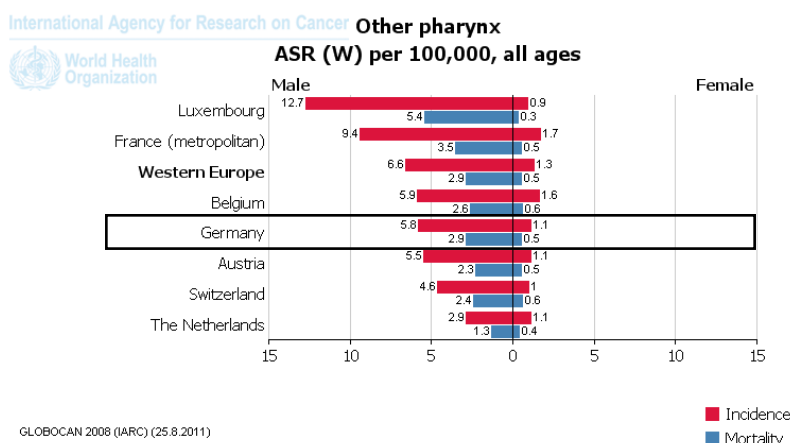


Abb. 1-8 Altersstandardisierte Inzidenz- (rot) und Mortalitätsraten (blau) bösartiger Neubildungen des Pharynx für westeuropäische Länder, stratifiziert nach Geschlecht.
 Abbildung gestaltet nach GLOBOCAN 2008; Cancer Incidence and Mortality Worldwide in 2008 (47).

In Deutschland standen bösartige Neubildungen der Mundhöhle und des Rachens im Jahr 2006 an siebthäufigster Stelle der Tumorneuerkrankungen bei Männern und an 16. Stelle bei Frauen. Insgesamt wurde bei 7.930 Männern und bei 2.930 Frauen ein solcher Tumor diagnostiziert (50). Damit sind Männer dreimal häufiger betroffen als Frauen. Vorwiegend sind ältere Menschen ab dem 55. Lebensjahr betroffen. Zwischen den Jahren 1980 und 1990 ist eine Inzidenz-Zunahme sowohl für Frauen als auch für Männer zu beobachten. Dagegen sind die Neuerkrankungsraten für Männer zwischen den Jahren 1990 bis 2006 rückläufig, während die der Frauen auch in dieser Periode vor allem bei den Altersgruppen der 50 bis 70-Jährigen weiter ansteigen (Abbildung 1-9).

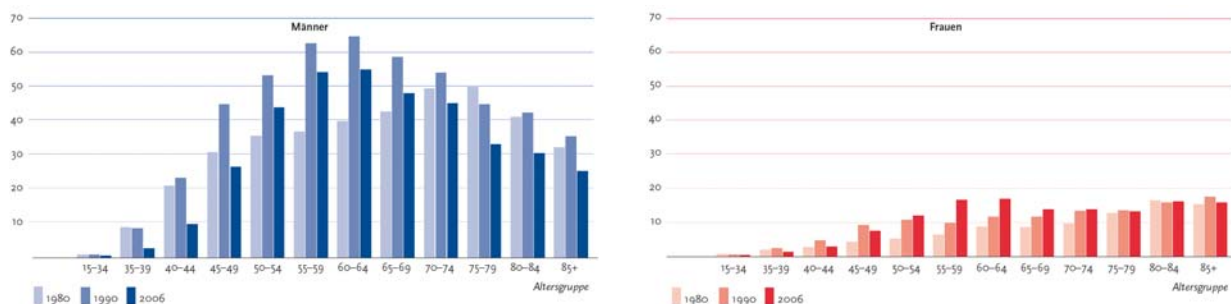


Abb. 1-9 Altersspezifische Neuerkrankungsraten bösartiger Neubildungen der Mundhöhle und des Rachens (ICD-C00 bis C14) in Deutschland nach Geschlecht für 1980, 1990 und 2006 (Fälle pro 100 000). Abbildung aus GEKID, 2010 (50).

Während der Trend einer rückläufigen Inzidenz der Kopf-Hals Tumoren auch in anderen westlichen Industrieländern beobachtet wird, wird für die Inzidenz von Tumoren des Oropharynx, vor allem der Tonsillen- und Zungengrundkarzinome, in den Industrieländern ein gegenläufiger Trend beobachtet. Für die Länder Kanada (51), USA (52), Großbritannien (53), Schweden (54), Dänemark (55), Niederlande (56) und Australien (57) wurde jeweils ein Anstieg der bösartigen Neuerkrankungen des Oropharynx berichtet.

Als Hauptrisikofaktoren für das HNSCC gelten Rauchen und ein übermäßiger Alkoholkonsum. So sind 75% der HNSCC in den USA auf den Konsum von Tabak zurückzuführen (52). Treten beide Hauptrisikofaktoren gemeinsam auf, dann verhält sich der Effekt der Faktoren multiplikativ (58).

Als weitere Risikofaktoren gelten eine übermäßige UV-Exposition, die vor allem bei Karzinomen der Lippen eine Rolle spielt, eine hauptsächlich durch Fleischkonsum geprägte Ernährung, während eine auf viel rohem Gemüse basierende Ernährung eine protektive Wirkung hat, sowie berufliche Expositionen mit krebserregenden Agenzien wie z. B. Asbest. In weiten Teilen Asiens, vor allem in Indien, stellt das Kauen von Betelnüssen einen Hauptrisikofaktor für das HNSCC dar; in Südamerika dagegen ist der Konsum von kochend-heißem Matete ein weiterer Risikofaktor für Kopf-Hals Tumoren.

Virale Infektionen spielen beim HNSCC als Risikofaktoren jedoch ebenso eine Rolle. Eine Infektion mit dem Epstein-Barr-Virus beispielsweise wird in Verbindung mit den Karzinomen des Nasopharynx gebracht (59), während humane Papillomviren (HPV) vor allem mit den Tumoren des Oropharynx assoziiert werden (43, 60-63). Allein durch die unterschiedlichen Tumorlokalisationen, sowie durch die Möglichkeit der Assoziation mit bestimmten Viren, weisen die Kopf-Hals Tumoren eine große klinische sowie biologische Heterogenität untereinander auf.

1.2.2 Heterogenität unter den HPV-assoziierten Kopf-Hals Tumoren

Erste Anhaltspunkte für eine Beteiligung von humanen Papillomaviren bei der Ätiologie von HNSCC gab es schon in den frühen 80-er Jahren (64). In den 90-er Jahren wurden erste Arbeiten publiziert, in denen eine spezifische Assoziation zwischen HPV und den Tumoren des Waldeyer'schen Rachenrings gefunden wurden, welcher die Rachen-, Gaumen- und Zungengrundtonsillen einschließt (60, 61, 65). Zudem fanden Andl *et al.* (60) zum ersten Mal ein besseres Gesamt- und progressionsfreies Überleben für die Patienten mit HPV-positiven Tonsillenkarcinomen, obwohl diese Tumoren im Vergleich zu den HPV-negativen Tumoren durch eine schlechte Differenzierung charakterisiert waren und die Patienten fortgeschrittenere Tumorstadien aufwiesen als die Patienten mit HPV-negativen Tumoren. Seit dem Jahr 2000 erschienen mehrere große Studien ($n > 90$ Fälle), die eine kausale Assoziation vor allem zwischen dem HPV-Typ 16 und den Oropharynxkarzinomen (*oropharyngeal squamous cell carcinomas*, OPSCC) bestätigten (66-72). In diesen Studien wurden zusätzlich mehr oder weniger gemeinsame Unterschiede zwischen den HPV-negativen und HPV-positiven OPSCC aufgezeigt. So waren Patienten mit HPV-positiven OPSCC in einigen Studien vor allem jünger (68, 73) und weiblichen Geschlechts (71), während andere Studien eine Assoziation zwischen HPV-positiven Tumoren und einer undifferenzierten Histologie (70, 73), einer kleinen Tumorgroße (41) und häufig das Vorhandensein regionaler Lymphknotenmetastasen zum Zeitpunkt der Primärdiagnose aufzeigten (73, 74). Des Weiteren waren Patienten mit HPV-positiven Tumoren durch einen geringeren Tabak- und Alkoholkonsum (41, 60, 75, 76), sowie einer erhöhten Anzahl von Sexualpartnern und von oral-genitalen oder oral-analen Kontakten charakterisiert (73, 77). HPV-positive Tumoren waren zudem weitaus seltener mit Mutationen im zellulären p53 Gen (60, 68, 78, 79) oder mit zytogenetischen Veränderungen (60, 68, 78-80) assoziiert als HPV-negative Tumoren. Vor allem aber wurde ein verbessertes Überleben für die Patienten mit HPV-positiven OPSCC in annähernd allen Studien belegt (66, 68, 71, 81-83). Eine Zusammenfassung der Unterschiede zwischen HPV-negativen und HPV-positiven Tumoren ist in Tabelle 1-1 dargestellt.

Unter den HPV-positiven OPSCC wurden jedoch auch Heterogenitäten festgestellt (61, 84), die auf Unterschiede in der Viruslast und/oder der viralen Onkogenexpression zurückzuführen waren (42, 43, 60, 70, 74, 80, 85-87). Bis heute wurden allerdings eine Assoziation zwischen der Viruslast und der viralen RNA-Muster hinsichtlich des klinischen Verhaltens der Tumoren und dem Überleben der Patienten nicht analysiert.

Tab. 1-1 Unterschiede zwischen HPV-negativen und HPV-positiven Kopf-Hals Tumoren.

	HPV-positive HNSCC	HPV-negative HNSCC
Patienteneigenschaften	jünger, weiblich	älter, männlich
Risikofaktoren	hohe Anzahl Sexualpartner; oral-genitale/-anale Kontakte	übermäßiger Alkohol- und/oder Tabakkonsum
Tumoreigenschaften	kleine Tumorgroße (T1-T2), häufig Lymphknoten-Metastasen	große Tumoren (>T2)
Tumorlokalisation	Oropharynx, v.a. Tonsillen	Regionen außerhalb des Oropharynx
Histologie/Morphologie	undifferenziert, basaloid	moderat bis gut differenziert
Molekularbiologische Eigenschaften	p53 und pRb Funktionsverlust durch Expression der viralen Onkogene E6 und E7	p53 Mutationen; Cyclin D1- Überexpression, p16 Promotorhyper- methylierungen; zyto- genetische Aberrationen; zytogenetische Instabilität
Therapieansprechen auf R/C*	gut	schlecht
Prognose	gut	schlecht
Inzidenz	ansteigend	sinkend

*R/C, Radio- und/oder Chemotherapie

1.2.3 Behandlungsmodalitäten – Status quo

Die traditionelle Behandlung von Kopf-Hals Tumoren schließt die operative Resektion des Tumors, sowie unter Umständen eine Ausräumung der Halslymphknoten mit umgebendem Fettgewebe (*Neck-Dissection*) und eine anschließende Radio- und/oder Chemotherapie ein. Die Operation als primäre Behandlungsmodalität bewahrt den Patienten auf der einen Seite vor der Toxizität einer Radio- oder Chemotherapie, geht jedoch auf der anderen Seite gerade bei Patienten mit größeren Tumoren häufig mit einem Funktionsverlust des Organs einher. Die verhältnismäßig kleineren Larynxtumoren werden daher oft mittels CO₂-Laserchirurgie entfernt, um eine weitere Funktion des Organs zu ermöglichen. Im Falle von inoperablen Tumoren wird durch primäre Radio- und/oder Chemotherapie zunächst versucht, den Tumor zu minimieren, und schließlich ggf. Resttumor operativ zu entfernen. Letztendlich ist die Wahl der Therapie von unterschiedlichen klinischen Faktoren abhängig, z. B. dem Tumorstadium, der Tumorlokalisation, dem Alter der Patienten, der allgemeinen

medizinischen Konstitution und auch der individuellen Präferenz des Patienten. Ungefähr die Hälfte aller HNSCC Patienten werden zum Zeitpunkt der Erstdiagnose mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium klassifiziert und haben heute eine Überlebensrate für 5 Jahre zwischen 40 und 60% (88).

Obwohl die unterschiedlichen biologischen und klinischen Eigenschaften zwischen den HPV-assoziierten HNSCC und den HPV-negativen Tumoren seit einigen Jahren bekannt sind, gibt es bislang keine unterschiedlichen Therapieansätze für die Patienten. Die derzeitigen Ergebnisse zum besseren Ansprechen der HPV-positiven Tumoren im Vergleich zu HPV-negativen Tumoren beruhen auf retrospektiven Studien, in denen fast ausschließlich ein besseres Überleben der Patienten mit HPV-assoziierten Tumoren (41, 42, 60, 68, 69, 89) unabhängig der verordneten Therapie nachgewiesen wurden (66, 81, 90-93). Herauszuheben ist aber die Studie von Lindel *et al.* (71), in der alle Patienten dasselbe Schema einer Strahlentherapie erhielten. Hier war das günstige Ansprechverhalten der HPV-positiven Tumoren auf die Therapie besonders deutlich (71). Zwar wird heute in den USA vorgeschlagen, die HPV-Analytik der Tumoren in die Diagnostik mit einzubeziehen (94), jedoch gibt es auch dort bislang keine unterschiedlichen Behandlungsansätze. Es fehlen weiterhin prospektive klinische Studien, in denen geklärt werden könnte, ob veränderte Behandlungsmodalitäten, wie z. B. eine Abschwächung der Therapie, die Lebensqualität der Patienten mit HPV-getriebenen Tumoren positiv beeinflussen, aber gleichzeitig das verbesserte Überleben der Patienten erhalten bleibt oder weiter verbessert werden kann.

1.3 Der Zellzyklus

Der Zellzyklus ist ein äußerst komplexer und fein regulierter Prozess, der durch eine Vielzahl regulatorischer Proteine gesteuert wird. Es werden durch ihn Zellwachstum und –proliferation, sowie die Reparatur von DNA-Schäden reguliert. Zentrale Proteine bei diesen Ereignissen stellen die Cyclin-abhängigen Kinasen (*cyclin-dependent kinases*, Cdk) und Cycline dar, die die Progression der Zelle durch die verschiedenen Phasen des Zellzyklus kontrollieren.

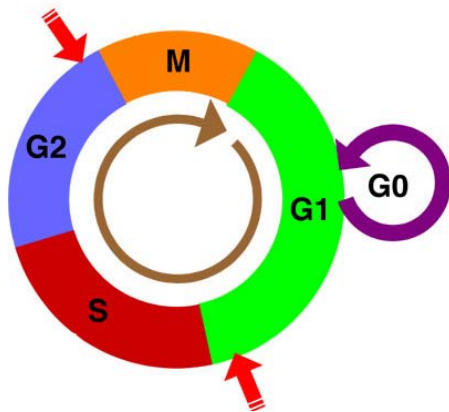


Abb. 1-10 Schematische Darstellung des Zellzyklus.

Zellen können in der G1-Phase den Zellzyklus verlassen und in einen Ruhezustand (G0-Phase) übergehen. G0 Zellen sind biochemisch aktiv, teilen sich aber nicht, bis sie stimuliert werden und in den Zellzyklus zurückkehren. Durch den Übertritt des Restriktionspunktes verpflichten sich Zellen zu einer Zellteilung und können erst wieder in der nächsten G1-Phase in den G0-Zustand eintreten.

Während des Zellzyklus gibt es zwei wichtige Kontrollpunkte (rote Pfeile): Einen in der G1-Phase (Restriktionspunkt), der durch das pRb-Protein reguliert wird und einen in der G2-Phase, der durch das p53-Protein reguliert wird. ([www.homepage.mac.com/enognog/cell%20 cycle.jpg](http://www.homepage.mac.com/enognog/cell%20cycle.jpg))

Für die Bildung zweier genetisch identischer eukaryotischen Tochterzellen wird dieser Prozess durch das Zellzyklus-Kontrollsystem reguliert, um zunächst eine Verdoppelung der DNA jedes Chromosoms fehlerfrei zu ermöglichen und um anschließend eine gleichmäßige Verteilung der verdoppelten DNA auf die Tochterzellen zu erreichen. Diese zwei bedeutenden Vorgänge sind für die zwei wichtigsten Phasen des Zellzyklus namensgebend: In der Synthesephase (S-Phase) wird die DNA verdoppelt, dagegen finden Chromosomentrennung und Zellteilung während der Mitose (M-Phase) statt. In den sogenannten Gap-Phasen (*gap* (engl.): Lücke; abgekürzt G-Phase), G1 und G2, die zwischen den S- und M-Phasen existieren (Abbildung 1-10), wird sichergestellt, dass die Zelle vor dem Eintritt in eine neue Syntheserunde eine ausreichende Größe erreicht hat und dass

eine Aufteilung der verdoppelten DNA erst dann erfolgt, wenn die Replikation der DNA fehlerfrei und vollständig abgeschlossen wurde. Es gibt außerdem für ausdifferenzierte Zellen die Möglichkeit von der G1- in die G0-Phase überführt zu werden. Die Zellen sind daraufhin proliferativ nicht mehr aktiv, können aber unter bestimmten Umständen wieder in die G1- und schließlich in die S-Phase zurückgeführt werden.

Genetische Schäden, wie z. B. durch ionisierende Strahlung oder bestimmte Chemikalien hervorgerufen, müssen zwingend vor Beginn der Chromosomen-Verdopplung (S-Phase) oder der Zellteilung (M-Phase) repariert werden, um die genetische Information der Zelle korrekt zu erhalten. Das Zellzyklus-Kontrollsystem ist in der Lage diese DNA-Schäden zu

erkennen und den Zellzyklus an den Kontrollpunkten anzuhalten. Es existieren zwei dieser Kontrollpunkte: einer in der späten G1-Phase, der den Eintritt in die S-Phase verhindert, und ein zweiter in der späten G2-Phase, der den Eintritt in die Mitose reguliert (Abbildung 1-10).

1.3.1 Bedeutung des Tumorsuppressorproteins p53

Das Genregulatorprotein p53 liegt in unbeschädigten Zellen in sehr geringen Konzentrationen vor. Dies ist auf seiner Interaktion mit der Ubiquitin-Ligase Mdm2 begründet, die den proteasomalen Abbau von p53 vermittelt.

Eine Schädigung der DNA führt jedoch zu einer Aktivierung von Proteinkinasen in der G1-Phase, die daraufhin p53 spezifisch phosphorylieren und somit dessen Affinität zu Mdm2 vermindern. Dadurch wird der Abbau von p53 verlangsamt und dessen Konzentration in der Zelle deutlich erhöht. P53 ist nun in der Lage, als Genregulatorprotein die Transkription mehrerer Gene anzutreiben, die das Fortschreiten von der G1- in die S-Phase verhindern oder die Apoptose induzieren (95). Eines dieser Gene codiert beispielsweise für das Cdk-Inhibitorprotein p21^{Cip1}, welches die Cyclin-abhängigen Kinasen (Cdk) in dieser Phase des Zellzyklus hemmt und somit den Zellzyklusarrest mitverursacht (Abbildung 1-11). Funktioniert diese Schadens-Kontrolle nicht, so häufen sich bei der Nachkommenschaft der Zelle die DNA-Schäden an und längerfristig führt diese Anhäufung zu einer erhöhten Häufigkeit von Mutationen, die letztlich in der Krebsentstehung münden können. Aus diesem Grund wird das p53-Protein als Tumorsuppressor deklariert.

1.3.2 Das Retinoblastomprotein (pRb) und Komponenten des pRb-Signalwegs bei der Regulation des Zellzyklus

Das Retinoblastomprotein (pRb) kontrolliert hauptsächlich die Aktivität des Transkriptionsfaktors E2F und gilt somit als ein Inhibitor des Zellzyklus (96) (Abbildung 1-11). Das Protein E2F reguliert die Transkription von Genen, die Proteine codieren, welche für den Eintritt in die S-Phase nötig sind, beispielsweise die G1/S-Cycline und S-Cycline, das heißt jene Cycline, die den Eintritt in die entsprechende Phase kontrollieren. Während der G1-Phase liegt pRb hypophosphoryliert mit E2F als Komplex vor und verhindert so die Transkription der S-Phase Gene. Wird die Zelle durch extrazelluläre Signale zur Teilung angeregt, kommt es zu einer Akkumulation der G1-Cdk und bildet Komplexe mit den entsprechenden Cyclinen, wie z. B. Cyclin D1/Cdk4, 6 oder Cyclin E/Cdk2. Diese Komplexe phosphorylieren pRb, wodurch dessen Affinität zu E2F vermindert wird. E2F wird schließlich frei und kann infolgedessen die Expression der S-Phase Gene aktivieren. Die Zelle geht von der G1- in die S-Phase über.

P16^{INK4a}, ein Cdk-Inhibitor mit dem Molekulargewicht von 16 kDa, bindet in Konkurrenz zu den D-Cyclinen spezifisch an die Cyclin-abhängigen Kinasen 4 und 6 (Cdk4, 6). Seine Funktion als Tumorsuppressor ist eng mit seiner Funktion bei der Seneszenz verknüpft: Durch die Hemmung der Phosphorylierung von pRb durch den Cdk4, 6/Cyclin D-Komplex wird der Zellzyklus angehalten und die Zelle kann den Zellzyklus verlassen (Abbildung 1-11). Die wachstumshemmende und tumorsupprimierende Wirkung von p16^{INK4a} ist jedoch von einem intakten pRb abhängig.

Die D-Typ Cycline stellen ein Bindeglied zwischen den extrazellulären mitogenen Signalen und der Regulation der pRb-Funktion dar. Die Überexpression des Proteins Cyclin D1 hat einen onkogenen Effekt auf den Zellzyklus; wie bei dem p16^{INK4a}-Verlust wird die pRb-Phosphorylierung und infolgedessen die E2F-Freisetzung beschleunigt. Ist pRb defekt, wird Cyclin D1 wie auch das p16^{INK4a}-Protein redundant. Im Gegensatz zu p16^{INK4a} wird Cyclin D1 jedoch nicht invers, sondern direkt durch pRb reguliert, d. h. bei defektem pRb wird auch Cyclin D1 nicht mehr oder nur vermindert exprimiert.

1.3.3 Aktive HPV-Beteiligung im HNSCC und die Auswirkungen auf den Zellzyklus

HNSCC mit aktiver HPV-Beteiligung haben meist ein intaktes p53-Gen (43, 60, 68, 78, 80, 84, 87, 97-100), jedoch wird das synthetisierte Protein durch das frühe Onkoprotein E6 von HPV16 inaktiviert (Abbildung 1-11). Dadurch sind Zellproliferation und Inhibierung der Apoptose begünstigt. Die Karzinome ohne HPV-Beteiligung weisen dagegen häufig Mutationen im p53-Locus auf (43, 60, 80). Viele Untersuchungen deuten darauf hin, dass p53-Mutationen sehr früh im Tumorgeschehen auftreten. Für die Tumprogression und die Prognose der Patienten scheinen sie keine ausgeprägte Bedeutung zu haben (101). Man geht trotzdem bislang von der Annahme aus, dass der p53-Status einen Einfluss auf das Ansprechen des Tumors hat. Therapeutische Maßnahmen wie z. B. ionisierende Strahlung oder bestimmte chemotherapeutische Arzneimittel, die DNA-Schäden in den Tumorzellen verursachen, rufen in Zellen mit intaktem p53-Gen über den p53-Signalweg einen Zellzyklus-Arrest und schließlich den apoptotischen Zelltod hervor. Dies könnte einer der Gründe sein, warum Patienten mit HPV-positiven Tumoren ein besseres Ansprechen auf die Behandlung und dementsprechend ein besseres Gesamt- und progressionsfreies Überleben zeigen.

Eine zentrale Rolle bei der Genese von HPV16-assoziierten HNSCC spielt das pRb-Protein, welches durch das virale Onkoprotein E7 von HPV16 inaktiviert wird (102). Dagegen ist ein Funktionsverlust z. B. durch Mutation im pRb-Gen beim HPV-negativen HNSCC selten (103-

105). Wird pRb jedoch durch das E7 Protein von HPV16 inaktiviert, so liegt E2F ständig frei vor und treibt die Zelle ungebremst von der G1- in die S-Phase (Abbildung 1-11).

In pRb-defekten Zellen wird zudem $p16^{\text{INK4a}}$ in hohen Mengen synthetisiert, ohne dass es inhibierend im Zellzyklus eingreifen kann (Abbildung 1-11). Dieser Zusammenhang ist bei Zervixkarzinomen konsistent gefunden worden, weshalb $p16^{\text{INK4a}}$ bei diesen Tumoren als Surrogat-Biomarker für die HPV-Aktivität gilt. Auch in vielen HPV-assoziierten Tonsillenkarzinomen wurde eine $p16^{\text{INK4a}}$ -Überexpression gefunden, aber bei weitem nicht bei allen. Deshalb wurde für die hier vorliegende Arbeit geprüft, ob $p16^{\text{INK4a}}$ als Surrogat-Marker für eine aktive Rolle von HPV16 beim OPSCC dienen kann. Generell zeigt ein großer Prozentsatz der Kopf-Hals Tumoren den Verlust von $p16^{\text{INK4a}}$, der in Zusammenhang mit p53-Mutationen gesehen werden kann. Ein weiterer und ähnlich großer Prozentsatz dieser Tumoren zeigt eine normal-niedrige Expression von $p16^{\text{INK4a}}$ (106).

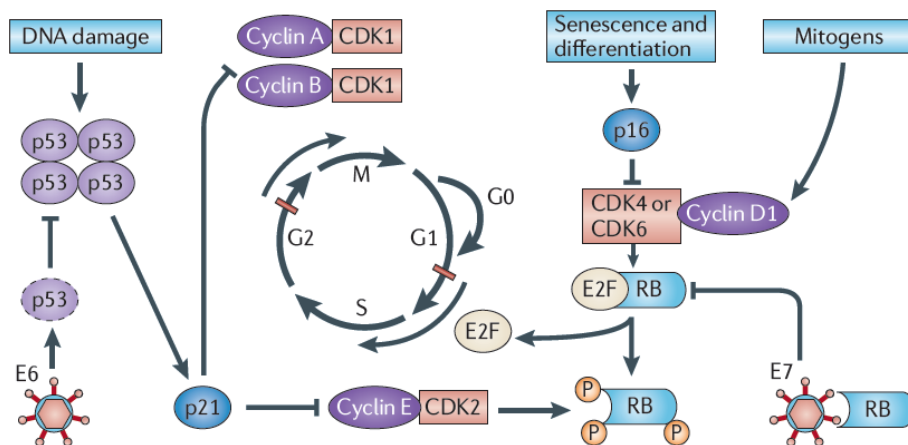


Abb. 1-11 Das Außerkraftsetzen der Zellzyklus-Regulation durch die Onkoproteine E6 und E7 von HPV16.

Der Zellzyklus wird durch die Cyclin/Cdk-Komplexe reguliert. Die Komplexe werden wiederum durch Cdk-Inhibitoren, z. B. p16, gesteuert. Die zwei Kontrollpunkte im Zellzyklus sind durch rote Balken dargestellt. Das HPV16 E6-Protein bindet zelluläres p53, welches infolgedessen degradiert wird, während das virale E7-Protein zelluläres pRb bindet und inaktiviert. Die Expression der viralen Onkoproteine führt dadurch zum Eintritt in die S-Phase und somit zur Zellproliferation; gleichzeitig wird die durch p53-vermittelte Apoptose inhibiert, wodurch die Virusreplikation erfolgen kann.

Abbildung aus (107)

Die Überexpression von Cyclin D1 ist für viele Tumorentitäten bekannt, so auch beim HNSCC (105, 108) und beruht häufig auf Genamplifikationen, Chromosomen-Translokationen oder mitogenen Stimuli der Gentranskription (105, 109, 110). Jedoch ist in pRb-defekten Zellen, also z. B. in Tumoren mit aktiver HPV16-Beteiligung, die Cyclin D1-Expression reduziert bzw. fehlt das Protein (60) (Abbildung 1-11). Deshalb könnte der Verlust oder die reduzierte Ausprägung von Cyclin D1 in analoger Weise wie der $p16^{\text{INK4a}}$ -Anstieg eine aktive Rolle von HPV16 in den hier untersuchten Oropharynx Tumoren anzeigen.

1.4 Probleme bei der Identifizierung von Oropharynxkarzinomen mit aktiver HPV16-Beteiligung

In den meisten bislang veröffentlichten HNSCC-Studien beschränkte sich die Analyse des HPV-Status auf p16^{INK4a}-Immunhistochemie als indirekter Nachweis oder PCR (HPV Genotypisierung) und/oder *In-situ* Hybridisierung (ISH) als direkter Nachweis. Die immunhistochemische Analyse von p16^{INK4a} für die Identifizierung von HPV-assoziierten Tonsillenkarcinomen allein ist jedoch ungenügend, da aus mehreren Studien klar wurde, dass ein gewisser Anteil (bis zu 20%) (41, 111-115) der HPV-negativen HNSCC ebenfalls die für HPV-assoziierte Tumoren typische p16^{INK4a}-Überexpression zeigten und auf der anderen Seite ein ebenso großer Anteil unter den HPV-positiven Tumoren p16^{INK4a}-negativ waren (82, 83, 115, 116).

Außerdem zeigte sich, dass der Nachweis von HPV DNA allein (durch PCR oder ISH/FISH) beim HNSCC nicht ausreichend ist, um eine kausale Assoziation zwischen Virus und Karzinogenese nachzuweisen – zumindest gilt dies für viele westeuropäische Länder. Nur der Nachweis der Expression der viralen Onkoproteine E6 und/oder E7 (in Kombination mit dem HPV DNA Nachweis) scheint biologisch und klinisch relevant (43, 86, 87, 97, 117). Jedoch ist die Analyse der viralen RNA-Transkripte bisher auf frisch-gefrorenes Tumormaterial beschränkt und so komplex, dass es in der Routinediagnostik noch nicht einsetzbar ist.

In einer Studie von Smeets *et al.* (114) wurde daher ein Algorithmus für Formalin-fixierte und in Paraffin-eingebettete (FFPE) HNSCC vorgeschlagen, der analog zur RNA-Analyse an Frischgeweben die Tumoren mit aktiver HPV16-Beteiligung identifizieren soll. Dieser Algorithmus beruhte auf der immunhistochemischen Analyse von p16^{INK4a}, gefolgt von einer HPV PCR bei p16^{INK4a}-positiven Tumoren; Tumoren, die sowohl für p16^{INK4a} als auch in der HPV PCR positiv waren, galten als Tumoren mit biologisch aktivem HPV16. Mit diesem Algorithmus konnte eine Sensitivität und Spezifität von jeweils 100% erreicht werden. Der Algorithmus wurde zudem noch mit anderen HPV-Detektionsmethoden verglichen, jedoch wurden für diese jeweils eine schlechtere Sensitivität (FISH) oder Spezifität (Antikörperanalysen im Serum) ermittelt. Allerdings war diese Studie auf nur 12 Tumoren limitiert. Einige andere Studien bestätigten diesen Algorithmus; sie konnten nicht nur eine verbesserte Sensitivität und Spezifität für die Identifizierung der Tumoren mit aktiver HPV-Beteiligung zeigen, sondern auch einen Zusammenhang mit einem besseren Überleben für die Patienten darstellen (112, 115, 118, 119).

Als weitere potentielle Biomarker für eine aktive HPV-Beteiligung gelten die zellulären Proteine pRb und p53, die direkt durch die Expression der viralen Onkogene E6 und E7 inhibiert werden und ebenfalls mittels Immunhistochemie an FFPE-Tumormaterial analysiert werden können. In der Studie von Andl *et al.* (60) konnte an einer relativ kleinen Kohorte (n=21) gezeigt werden, dass nur bei den E6 und E7 exprimierenden Tumoren von HNSCC-Patienten die zu erwartenden Konsequenzen auf das Wachstum und die Differenzierung der Tumorzellen, nämlich die erniedrigten Proteinexpressionslevel von pRb, p53 und Cyclin D1 sowie das erhöhte Proteinexpressionslevel von p16^{INK4a} nachweisbar waren. Die Expression dieser Proteine gilt daher als Surrogatmarker für eine aktive Beteiligung von HPV (43, 60, 117, 120-122), allerdings wurde deren Nutzen allein oder in Kombination untereinander oder mit anderen Markern bei der Identifikation von Tumoren mit aktiver HPV-Beteiligung an größeren Studien noch nicht untersucht.

Die Charakterisierung und Standardisierung von Biomarkern für die Identifizierung von HPV-assoziierten Oropharynxkarzinomen ist demnach essentiell; nicht nur um die Prognose für den Patienten abzuschätzen, sondern auch um in Zukunft einen anderen Therapieweg einzuschlagen. Die Biomarker müssen jedoch schnell, unkompliziert und mit geringen Kosten verbunden sein, um sie in der Routinediagnostik einsetzen zu können.

1.5 Ziele der Doktorarbeit

Es gibt unter den Plattenepithelkarzinomen der Kopf-Hals Region eine nicht unerhebliche Gruppe von Tumoren mit einer unklaren Beteiligung der humanen Papillomviren. Im Rahmen der vorliegenden Promotionsarbeit sollten verschiedene direkte (virale) und indirekte (zelluläre) Marker, sowie sinnvolle Markerkombinationen geprüft werden, um Plattenepithelkarzinome aus der Lokalisation des Oropharynx mit aktiver HPV-Beteiligung sicher und reproduzierbar zu identifizieren.

Für die direkte Analyse der Virus-DNA und für eine Unterteilung der Tumoren in Gruppen mit unterschiedlicher Viruslast sollte eine Kohorte von 199 Oropharynx Tumoren (OPSCC) zunächst mittels der BSGP5+/6+-PCR/Multiplex Genotypisierung (MPG) untersucht werden. Anschließend sollte durch eine quantitative *real-time* PCR (qPCR) die exakte Viruslast in den HPV16-positiven Tumoren bestimmt und mit den klinischen Krankheitsverläufen in Beziehung gebracht werden. An archiviertem Tumormaterial aus denselben Tumoren sollte die Fluoreszenz *In-Situ* Hybridisierung eingesetzt werden, um zu prüfen, ob diese schnelle Technik als kostengünstige Alternative zur Bestimmung der Viruslast in Frage kommt.

Des Weiteren sollten die HPV16 DNA-positiven Tumoren auf die E6*II und E6*I-Expression von HPV16 untersucht werden, da diese auf die Translation von E7 schließen lässt und somit als unabdingbar für die onkogene Aktivität des Virus gilt. Zusätzlich sollten die Tumoren, die für die E6*II und/oder E6*I Transkripte positiv waren, auf ein spezifisches virales RNA-Muster untersucht werden, das erst kürzlich als geeignet für die Diagnostik von hochgradigen Läsionen in der Zervix bzw. von Zervixkarzinomen beschrieben wurde (39).

Die Tumoren dieser Studie sollten außerdem mit Antikörpern gegen die zellulären Proteine p53, das Retinoblastomprotein (pRb) und zwei weiteren Komponenten des pRb-Signalwegs, p16^{INK4a} und Cyclin D1, immunhistochemisch gefärbt werden. Dafür sollte ein Gewebechip (Tissue Microarray, TMA) erstellt werden. Auch hier ging es darum, immunhistochemische Marker oder Markerkombinationen zu finden, die eine aktive Rolle des Virus anzeigen und für die Diagnostik von OPSCC an Formalin-fixiertem und in Paraffin-eingebettetem Material eingesetzt werden können.

2 MATERIAL

2.1 Gewebebiopsien

In der vorliegenden Arbeit wurden Gewebebiopsien von 199 Patienten der Hals-Nasen-Ohrenklinik des Universitätsklinikum Heidelberg eingeschlossen, die im Zeitraum von 1990 bis 2008 auf ein Plattenepithelkarzinom (PEC) des Oropharynx behandelt wurden. Die Studie wurde durch das Ethikkomitee der medizinischen Fakultät der Universität Heidelberg genehmigt und lief unter der Studiennummer 193/2003.

2.1.1 Gefriergewebe

Im Operationssaal wurden frische Gewebebiopsien direkt nach der Entnahme einem Mitarbeiter des Molekularbiologischen Labors der Hals-Nasen-Ohrenklinik übergeben und in Isopentan schockgefroren, das durch flüssigen Stickstoff auf ca. -100°C gekühlt wurde. Anschließend wurden die Gewebeproben in Kryoröhrchen überführt und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

2.1.2 Paraffingewebe

Die Gewebeproben wurden routinemäßig und zur Diagnosesicherung im Pathologischen Institut der Universität Heidelberg unmittelbar nach Eingang in Formalin fixiert und anschließend in Paraffin eingebettet. Die Paraffinblöckchen wurden von Frau Dr. med. Christa Flechtenmacher, Pathologisches Institut der Universität Heidelberg, begutachtet und zur Verfügung gestellt.

2.2 Verbrauchsmaterialien

96-well Waschplatten	Millipore, Bedford (MA, USA)
Abdichtungsfolie	HJ-Bioanalytik GmbH, Mönchengladbach
Adhäsionsobjektträger Super Frost [®] Plus	Menzel-Gläser, Braunschweig
DAKO Pen	Dako A/S, Glostrup, Dänemark
Deckgläser (24x36 und 24x50 mm)	Knittel Glasbearbeitungs GmbH, Bielefeld
Edelstahlkammer	
Einmalkittel	
Eisbox	
Falcon-Röhrchen (15/50 ml)	Greiner Bio-One GmbH, Frickhausen

Filterspitzen	Biozym Scientific GmbH, Oldendorf
Gewebekleber (Tissue Tec)	Jung, Leica Microsystems, Nussloch GmbH
Glasobjektträger	Marienfeld, Laboratory Glassware
Kryo-Aufbewahrungsboxen	Neolab, Heidelberg
Kryo-Probengefäße (1.2 ml)	Nalgene, Thermo Fisher Scientific, Roskilde/Denmark
Kryostat-/Mikrotomklingen C35	Feather Safety Razor Co., Ltd.
Mikropistille	Eppendorf AG, Hamburg
nucleasefreie Reaktionsgefäße (Safe-lock)	Eppendorf AG, Hamburg
PCR Aufbewahrungsboxen	Neolab, Heidelberg
PCR Reaktionsgefäße, Streifen mit Deckel (8 x 0.2 ml)	NerbePlus, Winsen/Luhe
PCR Racks, 96-well	Eppendorf, Hamburg
Pipettenspitzen	Micro-Bio-Tec-Brand, Giessen

2.3 Chemikalien

Aceton	
Ameisensäure	
EDTA (Ethyldiamintetraacetat)	
Eosin	
Ethanol, unvergällt	
Ethanol, vergällt	
Imidazol/PUFFERAN	
Isopentan (2-Methylbutan/ROTIPURAN)	Carl Roth GmbH & Co. KG, Karlsruhe
Natriumchlorid	
Natriumlaurylsulfat (SDS)	
Methanol	
Milchpulver, fettarm (NFDM)	
Tris	
Tween 20	
Xylol	

Natriumhydrogencarbonat	
Natriumthiocyanat (NaSCN)	
Paraformaldehyd (PFA)	Merck KGaA, Darmstadt
Salzsäure (1 N HCl)	
Wasserstoffperoxid (H ₂ O ₂) 30%	

Dextransulfat	Pharmacia Fine Chemicals AB, Uppsala, Schweden
Eukitt	Cat.No.: KIN E99, O. Kindler GmbH, Ziegelhofstraße 214, D-79110 Freiburg, Germany
Formamid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Fluka)
Hämalaun	Mayer's Haemalaun Solution, Cat. No.: A0884,2500, AppliChem GmbH, Ottoweg 4, D-64291 Darmstadt, Germany
Vectashield	LINARIS Biologische Produkte GmbH, Werheim-Bettingen
Wasser, DNase/RNase-frei	QIAGEN, Hilden

2.4 Puffer und Lösungen

2.4.1 PCR Puffer und Lösungen

dNTPs, je 25mM	Roth, Deutschland
25 mM Magnesiumchlorid	Applied Biosystems
10x AmpliTaqGold Puffer	Applied Biosystems

2.4.2 Luminex Puffer

Detektionslösung Luminex DNA/RNA	2 M TMAC 75 mM Tris-HCl, pH 8,0 6 mM EDTA, pH 8,0 1,5% Sarcosyl 1mg/ml Casein
Hybridisierungslösung Luminex DNA	0,15 M TMAC 75 mM Tris-HCl, pH 8,0 6 mM EDTA, pH 8,0 1,5% Sarcosyl
Hybridisierungslösung Luminex RNA	1,5 M TMAC 75 mM Tris-HCl, pH 8,0 6 mM EDTA, pH 8,0 1,5 % Sarcosyl
Hybridisierungswaschpuffer Luminex	0,02 % Tween 1 x PBS, pH 7,4
0,1 M MES Kopplungspuffer	4,88 g MES ad 250 ml H ₂ O 5 M NaOH zum Einstellen des pH- Wertes auf 4,5

Waschpuffer I	50 µl Tween 20 ad 250 ml H ₂ O
0,1% SDS Waschpuffer II	2,5 ml SDS (10%) ad 250 ml H ₂ O

2.4.3 IHC Puffer und Lösungen

10x PBS	80 g NaCl 2 g KCl 14,4 g Na ₂ HPO ₄ pH-Wert einstellen auf 7,4 ad 1000 ml ddH ₂ O
10x Citratpuffer, pH 6,0	29,4 g Tri-Natriumcitrat-Dihydrat mit Citronensäure den pH-Wert einstellen ad 1000 ml ddH ₂ O Aufbewahrung bei +4°C
10x TNT-Waschpuffer	157,6 g Tris-HCl 87,7 g NaCl pH-Wert einstellen auf 7,5 ad 1000 ml ddH ₂ O
TNT-Blockpuffer	1 g Blocking Reagent (TSA-Kit) 200 ml 1x TNT Waschpuffer 60°C Schüttelinkubator Aliquotieren und bei -20°C lagern
TE-Puffer, pH 8,0	10 mM Tris 0,2 M EDTA zum Einstellen des pH- Wertes

2.4.4 Puffer für die Fluoreszenz *In-Situ* Hybridisierungen

20x SSC, pH 7,0	3 M Natriumchlorid 0,3 M Tri-Natriumcitrat-Dihydrat Citronensäure zum Einstellen des pH- Wertes
Maleinsäure-Puffer, pH 7,5	100 mM Maleinsäure 150 mM Natriumchlorid NaOH-Plättchen zum Einstellen des pH-Wertes
Waschpuffer	2x SSC 0,05% Tween

2.5 Enzyme

AMV-Reverse Transkriptase	Roche, Applied Science, Mannheim
DNase I, RNase-frei	QIAGEN, Hilden
E.coli RNase H	NEB Biolabs, Frankfurt am Main
Pepsin	Sigma-Aldrich, Inc., Saint Louis, USA
T7 RNA Polymerase	MBI Fermentas GmbH, St. Leon-Rot
Thermostabile DNA Polymerase, AmpliTaqGold	Roche, Applied Science, Mannheim

2.6 Antikörper

Anti-p16 ^{INK4a}	monoklonal, mouse MTM-E6H4 Clone No.: E6H4, Cat. No.: MTM-E6H4, MTM Laboratories, INF 583, 69120 Heidelberg
Anti-pRb	monoklonal, mouse 1F8 Clone No.: 1F8, Cat. No.: NCL-RB, Visionbiosystems Novocastra, Balliol Business Park West, Benton Lane, Newcastle upon Tyne NE12 8EW, United Kingdom
Anti-Cyclin D1	monoklonal, mouse DCS-6 Clone No.: DCS-6, Cat. No.: M7155, Dako Denmark A/S, Produktionsvej 42, DK-2600 Glostrup, Denmark
Anti-p53	monoklonal, mouse Bp53-11 Clone No.: Bp53-11, Cat. No.: 61039, PROGEN Biotech GmbH, Maaßstraße 30, 69123 Heidelberg
Sekundärantikörper (Biotinylierter Anti-Maus IgG)	Vector Laboratories Inc., CA 94010 USA

2.7 Kommerziell erwerbliche Kits

DAB Substrate Kit for Peroxidase	DAB Substrate Kit for Peroxidase, Cat.No.: SK-4100, Vector Laboratories Inc., CA 94010, USA
DAKO-buffer	DAKO Target Retrieval Solution pH9 (10x), Cat.No.: S2367, Dako Denmark A/S, Produktionsvej 42, DK-2600 Glostrup, Denmark
ImmPRESS TM Detection System - Anti-Mouse Ig Peroxidase	LINARIS Biologische Produkte GmbH, Wertheim-Bettingen
Nuclisens EasyQ kit	bioMérieux Deutschland GmbH, Nürtingen

QIAamp® DNA Mini Kit (250)	QIAGEN, Hilden
RNeasy Mini Kit+QIAshredder (250)	QIAGEN, Hilden
TSA™ Kit	NEL700 200-600 slides, Cat.No.: NEL700001KT, PerkinElmer LAS Inc., 549 Albany Street, Boston, MA 02118- 2512, USA.
TSA-Kit für FISH	Invitrogen, Molecular Probes

2.8 Oligonukleotide

Die PCR-Primer für die Multiplex HPV-Genotypisierung (BSGP5+/6+, Beta-Globin), die quantitative *real-time* PCR (qPCR) und für die HPV16 RNA-Analysen (P1 und P2 für die viralen Transkripte E6*II, E1⁺E4, E1C, L1 und die entsprechenden Kalibratoren) wie auch die Sonden zur anschließenden Hybridisierung wurden im DKFZ von Dr. Markus Schmitt (Labor Michael Pawlita) entwickelt und zur Verfügung gestellt. Für die Primer und Sonden der qPCR dürfen aus patentrechtlichen Gründen in dieser Arbeit keine näheren Angaben gemacht werden; die Sequenzen sind auf Anfrage bei Dr. M. Schmitt erhältlich.

Die Primer wurden von der MWG Biotech AG, Ebersberg, bezogen und hatten höchsten Reinheitsgrad (HPLC purification quality). Primersequenzen sind von 5' nach 3' Richtung dargestellt.

2.8.1 Multiplex PCR Primer

Tab. 2-1 BSGP5+/6+ Primer Sequenzen

Primer Name	Richtung ¹	Primer Sequenz ²
B-globin		
Bg3f	F	AATATATGTGTGCTTATTTG
Bg3b	B	AGATTAGGGAAAGTATTAGA
HPV		
GP5+	F	TTTGTTACTGTGGTAGATACTAC
BSGP5+-2	F	TTTGTTACTGTTGTIGATACTAC
BSGP5+-3	F	TTTGTTACTGTTGTIGATAACCAC
BSGP5+-4	F	TTTGTTACTTGTGTIGATACTAC
BSGP5+-5	F	TTTTAACTGTTGTIGATACTAC
BSGP5+-6	F	TTTGTTACTGTGGTAGACACTAC
BSGP5+-7	F	TTTGTTACAGTIGTAGACACTAC
BSGP5+-8	F	TTTGTTACAGTIGTAGATAACCAC
BSGP5+-9	F	TTTGTTACTGTGGTAGATAACCAC
bio-GP6+	B	GAAAAATAAACTGTAAATCATATTC
bio-BSGP6+-b	B	GAAAAATAAATTGTAAATCATACTC
bio-BSGP6+-c	B	GAAAAATAAATTGCAATTCATATTC

¹ F, vorwärts (*forward*); B, rückwärts (*backward*)

² Beta-Globin Primer haben eine Länge von 20 Nucleotiden; BSGP5+/6+ F-Primer haben eine Länge von 23 und BSGP5+/6+ B-Primer eine Länge von 25 Nukleotiden; I, Inosin.

2.8.2 NASBA Primer

Tab. 2-2 NASBA Primer (P1 und P2)

RNA Zielsequenz		Primer Sequenz
226^526 (E6*II)	P1	AATTCTAATACGACTCACTATAGG GGAGA gatcagttgtctctggtgca
	P2	atatactacggatggcctgGTGTACTGCAAGCAACAGTTA
880^2582 (E1C)	P1	AATTCTAATACGACTCACTATAGG GGAGAG ggatttccgttttcgtaaatgga
	P2	atatactacggatggcctgCATCTGTTCTCAGAAACCATA
880^3358 (E1^E4)	P1	AATTCTAATACGACTCACTATAGG GGAGAG ctgtgtttcttcggtgccca
	P2	atatactacggatggcctgCATCTGTTCTCAGAAACCATA
3632^5639 (L1)	P1	AATTCTAATACGACTCACTATAGG GGAGA catgataatatgtttgtgcgtgcaa
	P2	atatactacggatggcctgAATAGTAACACTACACCCATA
ubc (Ubiquitin C)	P1	AATTCTAATACGACTCACTATAGG GGAGA tcacgaagatctgcattgtca
	P2	atatactacggatggcctgGGATCTCCGTGGGGCGGTGA

P1 Primer bestehen aus einer T7 RNA Promotorsequenz (5'; Großbuchstaben), gefolgt von purinreichen Nukleotiden (fett) und der Zielsequenz (Kleinbuchstaben).

P2 Primer bestehen aus einer generischen Sequenz (Kleinbuchstaben) und der Zielsequenz (Großbuchstaben).

2.8.3 Oligonukleotidsonden

Die Sequenzen der Oligonukleotidsonden sind von 5' nach 3' Richtung dargestellt. Alle Sonden wurden mit einer 5'-Amin C₁₂-Spacer Modifikation versehen (von MWG Biotech AG, Ebersberg).

2.8.3.1 Multiplex HPV-Genotypisierung

Tab. 2-3 Oligonukleotidsonden für die MPG-Analyse

HPV Typ	Sondensequenz	Länge
6	TCC GTA ACT ACA TCT TCC A	19-mer
11	TCT GTG TCT AAA TCT GCT AC	20-mer
16	TAC CTA CGA CAT GGG GAG	18-mer
18	TGC TTC TAC ACA GTC TCC T	19-mer
26	GTA CAT TAT CTG CAG CAT C	19-mer
30	CAC ACA AAC GTT ATC CAC A	19-mer
31	GCA ATT GCA AAC AGT GAT AC	20-mer
33	TGC ACA CAA GTA ACT AGT GA	20-mer
35	CTG CTG TGT CTT CTA GTG A	19-mer
39	TAC ATT ATC TAC CTC TAT AGA	21-mer
43	TCT ACT GAC CCT ACT GTG	18-mer
44	TAC TAG TGA ACA ATA TAA GCA	21-mer
45	TAA TTT AAC ATT ATG TGC CTC	18-mer
51	TGC TGC GGT TTC CCC AA	17-mer
52	GAA TAC CTT CGT CAT GGC	18-mer
53	TGT CTA CAT ATA ATT CAA AGC	21-mer
56	GAT GCA CGA AAA ATT AAT CAG	21-mer
58	TAT GCA CTG AAG TAA CTA AG	20-mer
59	AGA ATA TGC CAG ACA TGT G	19-mer
66	CGT GAA ATC AAT CAA TAC CTT	22-mer

67	GGA AAA ATC AGA GGC TAC A	19-mer
68 (ME180)	CTG AAT CAG CTG TAC CAA A	19-mer
68 (x67161)	CCA CTA CTA CAG ACT CTA CTG	21-mer
69	CAT CTG CCA CTT TTA AAC C	19-mer
70	TTT ACA TTG TCT GCC TGC A	19-mer
73	GTA TGC CCA CTC WAA TTT TAA	21-mer
82	ACT CAA RCA AAC TTT AAG CAG	22-mer
Beta-Globin	CTT CTT TTA ATA TAC TTT TTT	24-mer
Universal 1	GiC ATG iiG ARG AAT ATG A	19-mer
Universal 2	GMC AYR CAG ARG AAT ATG A	19-mer

W = A/T, R = A/G, i = Inosin, M = A/C, Y = C/T

2.8.3.2 NASBA Hybridisierungssonden

Tab. 2-4 Oligonukleotidsonden für die NASBA-Analyse

Transkript	Kalibratorsequenz	Sondensequenz
E6*I (226^409)		CGACGTGAGGTGTATTAAC
E6*II (226^526)	AGAAGACTGAGCAGGTTCC	GCGACGTGAGATCATCAAG
E1C (880^2582_T)	TATTCGGCGACGACCGGCTT	TCCTGCAGATTCTAGGTGGC
E1C (880^2582_C)		TCCTGCAGATTCCAGGTGGC
E1^E4 (880^3358)	AGAGCTCTCCAGGACACTG	TGATCCTGCAGCAGCAACG
L1 (3632^5639)	AGAATTAGTTCCTTACTAAT	TACATTTAAAAGATGTCTCTTT
Ubiquitin C	CGACTTTCGTTGTTGTTGTGA	TCGCAGTTCTTGTGTTGTGGATC

2.8.4 Fluoreszenz *In-Situ* Hybridisierung (FISH)

Die Sonden für die HPV16 FISH wurden im Labor ‚Cancer (cyto)Genetics‘ unter der Leitung von Ernst-Jan Speel, in Maastricht, Niederlande generiert und freundlicherweise durch Ernst-Jan Speel zur Verfügung gestellt. Die HPV16 Sonden wurden in einer ‚Nick translation‘ Reaktion entweder mit Digoxigenin (DIG) oder mit Biotin (BIO) markiert und umfassten das gesamte HPV16 Plasmid mit ca. 8 kBp. In dieser Arbeit wurden ausschließlich Biotin-markierte Sonden zur Detektion der viralen DNA in den Tumorzellen verwendet.

2.9 Geräte

Analysewaage	Sartorius GmbH, Göttingen
Autoklav, VX95	Systec GmbH, Wettenberg
Dampfgarer (MultiGourmet)	Braun GmbH
Eismaschine	AF20, Scotsman
Feinwaage	Sartorius GmbH, Göttingen
Fluoreszenzmikroskop, Typ „BX50F“	Olympus Microscopy, Hamburg
Gilson Pipetten (2 µl, 20 µl, 200 µl, 1000 µl)	Gilson-Abimed, Düsseldorf
Hamamatsu NanoZoomer Scanner	Hamamatsu Photonics GmbH
Kryostat, Typ „2800 Frigocut“	Leica, Nussloch
Kühlschrank 4°C	Liebherr
Laborofen	Bachofer, Reutlingen
Luminex 100 Analyser	Luminex Corp. Austin, Texas
Mastercycler Eppendorf	Eppendorf, Hamburg
Mikrowellengerät	Robert Bosch GmbH, Stuttgart
Motorpipette, 8-Kanal, Precision® 50 - 1200 µl	Biozym Diagnostik, Hessisch Oldendorf
PCR-Thermocycler (Gene Amp System 2400)	PCR Perkin Elmer, Wellesley (MA, USA)
pH-Meter	WTW, Weilheim
Pipette, 8-Kanal, 20 - 200 µl	Brand, Roskilde (Dänemark)
Pipette, 8-Kanal, Biohit Pipettors 5 - 120 µl	Biohit PLC, Helsinki (Finland)
Pipettierhilfe PIPETBOY	Integra Biosciences, Fernwald
Pipettier-Roboter QIAgility	QIAGEN, Hilden
Roche LightCycler 480 Real-Time PCR System	Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Roche Applied Science, Mannheim
Stanzgerät	AlphaMetrix Biotech GmbH, Rodgau
Thermomixer	Eppendorf AG, Hamburg
Tiefkühlschrank -20°C	Liebherr
Tiefkühltruhe -80°	Harris
Tischzentrifuge	Eppendorf AG, Hamburg
Vacuum Waschstation	Millipore, Bedford (MA, USA)
Vortexer	Kurt Migge GmbH, Heidelberg
Wasserbad	GFL; M&S Laborgeräte GmbH
Wasseraufbereitungsanlage, Milli-Q	Millipore, Bedford (MA, USA)

2.10 Computer Software

Adobe Acrobat 9.0; Photoshop; Illustrator

Adobe Systems Inc., San Jose, CA, USA

Endnote X3

Thomson Reuters, San Francisco, CA, USA

GraphPad Prism V5

GraphPad Software Inc., CA, USA

Hamamatsu NanoZoomer Digital Pathology (NDP-Viewer)

Hamamatsu Photonics GmbH

IBM SPSS Statistics 19

IBM Corporation, Somers NY, USA

IS-H*med

Siemens Medical Solutions GSD GmbH, Berlin

Luminex 100 IS 2.3 SP1 Software

Luminex Corp., Austin TX, USA

Microsoft Access 2007

Microsoft Corp., Unterschleißheim

Microsoft Office 2007

Microsoft Corp., Unterschleißheim

Microsoft Windows XP

Microsoft Corp., Unterschleißheim

SAS 9.2

SAS Institute Inc., NC, USA

Sigma Plot 11

Systat Software, Erkrath, Deutschland

3 METHODEN

3.1 Klinische Datenerhebung und Patientenkollektiv

Da die Prävalenz einer Infektion mit humanen Papillomviren der Hochrisiko-Gruppe in der Oropharynx-Region als am höchsten gilt (siehe 1.2.2, Einleitungsteil), wurden für die vorliegende retrospektive HPV-Studie lediglich Karzinome dieser Lokalisation eingeschlossen. Zunächst wurden alle Patienten aus der Datenbank herausgefiltert, zu denen frisch-gefrorenes Tumorgewebe mit Lokalisation im Oropharynx vorhanden war. Zu diesen Patienten (n=199) wurden im Jahr 2008 die wesentlichen klinischen Daten aus den elektronischen Patientenakten des Universitätsklinikums Heidelberg erfasst und in die laborinterne Datenbank eingetragen. Erfasste Informationen waren Geburtstag, Geschlecht, Datum und Region des Primärtumors im Oropharynx (Einteilung: 1, Tonsille (Oro/Tons); 2, Zungengrund (Oro/Zgr), 3, andere Regionen (Oro/Sonst.)), Primär-Therapie, Histologie, klinisches Staging (TNM Status und daraus resultierend das klinische Stadium), letzte Vorstellung bzw. Todesdatum (Tod tumorabhängig oder –unabhängig), sowie die Nachfolgeereignisse (Lokalrezidiv, Lymphknotenmetastase, Zweitkarzinom und Fernmetastase) mit Datumsangabe; gegebenenfalls wurden die entsprechenden niedergelassenen Ärzte der Patienten kontaktiert und/oder die Originalakten geordert. Zu den Risikofaktoren Tabak und Alkohol waren Ja/Nein/Ex-Angaben vorhanden, Mengenangaben lagen in den meisten Fällen nicht vor.

Einschlusskriterien für die vorliegende Studie waren (i) pathologisch gesicherte primäre Plattenepithelkarzinome des Oropharynx, (ii) Oropharynxrezidive mit bekanntem HPV-Status der entsprechenden Primärtumoren, (iii) Lymphknotenmetastasen von Primärtumoren des Oropharynx mit bekanntem HPV-Status. Daraus ergab sich ein Patientenkollektiv, welches 185 primäre Plattenepithelkarzinome des Oropharynx umfasste, 4 Lymphknotenmetastasen und 10 Oropharynxrezidive jeweils mit bekanntem HPV-Status der entsprechenden Primärtumoren. Zusätzlich wurden von fünf gesunden Patienten normale Mundschleimhautbiopsien der Uvula als Kontrollmaterial und Referenz eingeschlossen.

3.2 Gewebeschnitte

Die Biopsien wurden aus der -80°C Kühltruhe in flüssigem Stickstoff zum Kryostat transportiert und dort bei einer Temperatur von -23°C mit Gewebekleber fixiert und anschließend geschnitten. Für die DNA- und RNA-Extraktion wurden je Biopsie Schnitte von 16 µm Dicke bis zu einem Gesamtgewicht von jeweils ca. 5-10 mg angefertigt. Die Gewebeschnitte wurden mit Hilfe einer gelben Pipettenspitze in ein mit flüssigem Stickstoff

gefülltes 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und mit einem Pistill gemörsert. Die gemörserten Gewebebiopsien wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Die Reaktionsgefäße wurden jeweils ohne, sowie mit Inhalt gewogen, um das Gewicht des geschnittenen Gewebes zu ermitteln. Das Gewicht lag zwischen 2 und 10 mg.

Im Anschluss an die Gewebeschnitte wurden von jeder Biopsie zwei je 4 bis 5 µm dicke Schnitte angefertigt, die auf einen Objektträger aufgezogen wurden. Diese Schnitte wurden mit Hämalaun und Eosin gefärbt, um den Tumoranteil sowie die Histologie der jeweiligen Biopsie bestimmen zu können.

Um mögliche Virus-DNA Kontaminationen zu vermeiden, wurde das Kryostat nach jeder Biopsie gründlich mit Aceton gereinigt. Zusätzlich erfolgte nach jeder Biopsie ein Messer- sowie Handschuhwechsel. Die Schnittreihenfolge der Biopsien wurde notiert, um eine mögliche Kontamination verfolgen zu können. Zusätzlich wurden potentiell HPV-negative Präparate (Uvulaschleimhaut von gesunden Patienten) zwischen den Tumoren geschnitten.

3.3 HE-Färbung

Zur Bestimmung des Tumoranteils der jeweiligen Biopsien, sowie zur Kontrolle der Morphologie und Histologie, wurden die 4 bis 5 µm Schnitte mit Hämalaun und Eosin gefärbt. Der basische Farbstoff Hämalaun färbt dabei die Zellkerne des Präparates blau, während der Farbstoff Eosin das Cytoplasma rot erscheinen lässt.

Nachdem die Schnitte auf Objektträger aufgezogen wurden, wurden sie mindestens 24 Stunden bei RT getrocknet und anschließend für 10 Minuten in die Färbelösung Hämalaun gestellt. Danach wurden die Schnitte durch Spülen mit Leitungswasser gebläut. Durch den pH-Wert des Leitungswassers erhält der basische Farbstoff seine typische blau-violette Färbung. Nach dem Bläuen wurden die Schnitte 10 Minuten lang in 1%-Eosinlösung gebadet. Danach wurden sie kurz mit ddH₂O gewaschen und in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70%, 96% und 100%) dehydriert. Zum Schluss wurden die Schnitte nach einem Xylolbad mit dem Einbettmedium Eukitt eingedeckt.

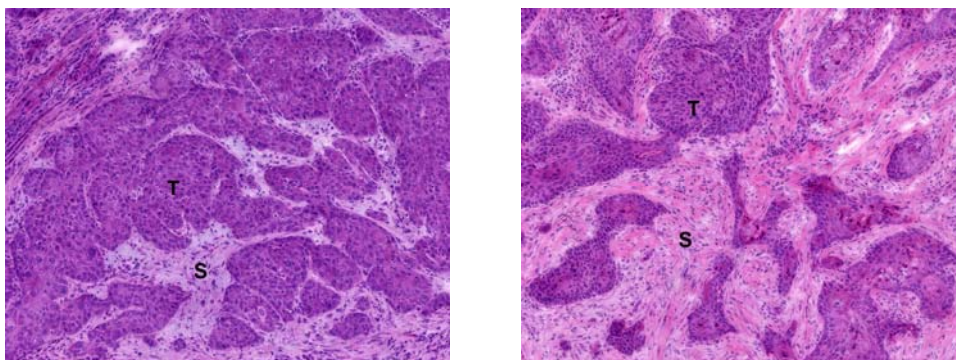


Abb. 3-1 Beispiele einer HE-Färbung von Oropharynx Tumoren mit 90% (A) und 60% (B) Tumoranteil. S, Stroma; T, Tumor. Aufnahmen mit 10x Objektiv.

3.4 HPV DNA-Analyse

3.4.1 DNA Extraktion

Die Tumoren wurden auf die Prävalenz von HPV DNA analysiert. Dafür musste die DNA zunächst aus dem Gewebe isoliert werden. Die DNA Extraktion aus den gemörsterten Biopsien erfolgte mit dem QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen).

Das gemörserte Material wurde dabei in ATL-Puffer und Proteinase K resuspendiert und 3 Stunden bei 56°C inkubiert. Die folgenden Schritte wurden nach dem Protokoll des Kits durchgeführt. Das Prinzip des Kits beruht auf der Fällung der DNA mit Ethanol und der Bindung an eine Säule (QIAamp Spin Column). Nach dem Waschen der DNA mit den entsprechenden Puffern, wurde die DNA zweimal mit jeweils 200 µl AE-Puffer eluiert. Die DNA-Lösungen wurden bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

Laut Protokollangabe des Kits erhält man je 5 mg Gewebe 2 bis 6 µg DNA. Für die Multiplex HPV-Genotypisierung stand demzufolge DNA von Plattenepithelkarzinomen des Oropharynx mit einer Menge von 2-12 µg pro Biopsie zur Verfügung.

3.4.2 BSGP5+/6+-PCR/Multiplex HPV-Genotypisierung (MPG)

3.4.2.1 *BSGP5+/6+-Polymerase Kettenreaktion*

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) erlaubt die Amplifizierung spezifischer DNA-Sequenzen aus kleinsten Mengen an Ausgangsmaterial. In sich wiederholenden Zyklen aus DNA-Denaturierung, Primer-Hybridisierung und Elongation werden spezifische DNA-Sequenzen amplifiziert. Die Reaktion wird durch eine thermostabile DNA-Polymerase katalysiert, die zusätzlich dNTPs und zwei Oligonukleotidprimer benötigt.

Durch die *broad-spectrum general-primer* PCR (BSGP5+/6+-PCR) wurde eine ~150 bp lange Sequenz des viralen L1 ORF amplifiziert (123, 124). Während der BSGP5+/6+-PCR werden Primer verwendet, die komplementär zu konservierten Regionen des viralen L1-Gens sind. Das Amplikon wiederum ist durch eine polymorphe Sequenz charakterisiert, so dass dadurch die Amplifizierung von HPV Typ-spezifischen Amplimeren mit annähernd gleicher Länge in einer Reaktion gewährleistet ist. Theoretisch könnten damit bis zu 100 verschiedene HPV-Typen parallel in einer Probe nachgewiesen werden; die in dieser Arbeit verwendete BSGP5+/6+-PCR schloss 27 mukosale HPV-Typen ein (*high risk* (HR) HPV-Typen: 16, 18, 31, 33, 35, 35*variant*, 39, 45, 51, 52, 56, 58, 59, 68, 73, 82; putative HR Typen: 26, 53, 66; *low risk* Typen: 6, 11, 43, 44, 70 und HPV-Typen unbekannten Risikos: 30, 67, 69) (123, 124).

Aufgrund der Vielzahl verschiedener HPV-Typen muss die PCR jedoch eine Reihe von Fehlpaarungen („mismatches“) zwischen den Primern und den DNA-Sequenzen der zahlreichen HPV-Typen überwinden. Dies geschieht durch die Wahl spezieller PCR-Bedingungen: 3,5 mM MgCl₂ und 38°C Primerhybridisierungstemperatur.

Bei dieser PCR wurden neun Vorwärtsprimer und drei Rückwärtsprimer (f 1-9; b 1-3) eingesetzt. Die b 1-3 Primer waren an ihrem 5'-Ende mit Biotin markiert. Dadurch erhalten die amplifizierten PCR-Produkte einen biotinylierten DNA-Strang, der an die typspezifischen Oligonukleotidsonden hybridisieren kann. Mit Hilfe der Biotingruppe kann letztlich die An- oder Abwesenheit von HPV DNA im Multiplex HPV DNA Detektionsassay nachgewiesen werden (siehe 3.4.2.3, Methodenteil).

Durch die BSGP5+/6+-PCR wurde die HPV DNA-Prävalenz in den 199 Oropharynxkarzinomen analysiert. Zusätzlich wurden HPV16 Plasmid-Standards mit 1, 10, 100 und 1000 Genomkopien pro 100 ng humaner Plazenta DNA als Positivkontrollen und Wasser als Negativkontrollen verwendet.

PCR Mix für 40 µl Reaktionsvolumen pro Ansatz:

0,4 µl dNTPs (Endkonz. 0,2 mM)

5 µl PCR Puffer (Q solution)

4 µl MgCl₂ (Endkonz. 3,5 mM)

1,5 µl BSGP5+/6+ Primer Mix

je 0,2 µl Beta-Globin Primer (Bg3f; Bg3b)

0,2 µl AmpliTaq Gold DNA Polymerase (1 Unit)

28,7 µl ddH₂O

10 µl Proben-DNA bzw. Wasser für die Negativkontrollen

Die PCR lief nach folgendem Programm:

Schritt I: Aktivierung der AmpliTaq Gold Polymerase (Hot Start)

94°C, 15 min

Durch hitzelabile Modifikationen der DNA Polymerase ist das Enzym bei RT inaktiv. Es wird erst nach einer 15 min Inkubation bei 95°C aktiviert, da in dieser Zeit durch die hohe Temperatur die hitzelabilen Modifikationen von der thermostabilen DNA-Polymerase abgespalten werden.

Schritt II: Denaturierung

94°C, 20 sec

Ramping rates: in 1,8°C/sec auf 38°C abkühlen

Schritt III: Primeranlagerung

38°C, 30 sec

Ramping rates: in 2°C/sec auf 71°C erhitzen

Schritt IV: Elongation

71°C, 80 sec

Ramping Rates: in 2,5°C/sec auf 94°C erhitzen

Wiederholung der Schritte II-IV 39-mal.

Schritt V: End-Elongation

71°C, 4 min

Schritt VI: Kühlung der PCR-Produkte bis zur Entnahme

4°C, endlos

Die hohe Sensitivität der BSGP5+/6+-PCR macht sie sehr anfällig für Kontaminationen. Um eine Kontamination der Proben durch PCR-Produkte oder die Übertragung viraler DNA von Probe zu Probe zu verhindern, wurden spezielle Vorkehrungen getroffen und spezielle Bedingungen gewählt: Die DNA-Extraktion, PCR-Präparation, PCR-Amplifikation und die PCR-Produktanalyse wurden jeweils in verschiedenen Räumen durchgeführt. Zusätzlich wurden Reagenzienaliquotierung, Pipettieren der DNA und Mastermixpräparation an verschiedenen Sterilbänken vorgenommen. Es wurden ausschließlich durch Autoklavieren sterilisierte PCR-Reaktionsgefäße und sterile Filterspitzen benutzt. Während der ganzen Prozedur wurden Einmalkittel bzw. unterschiedliche Laborkittel und Handschuhe für jeden Raum getragen. Der Transfer von Proben und Material nach der PCR in den Proben-vorbereitungs-Raum wurde vermieden. Durch diese Vorsichtsmaßnahmen und die Säuberung des Kryostats sowie den Messerwechsel nach dem Schneiden jeder Biopsie konnten mögliche Kontaminationen vermieden werden.

Die in den PCR-Reaktionen entstandenen Amplimere wurden letztendlich durch die Multiplex HPV-Genotypisierung im Luminex Analyser untersucht.

3.4.2.2 *Beta-Globin PCR – DNA Integritätskontrolle*

Die Amplifizierung von Beta-Globin Sequenzen ist eine weit verbreitete Methode, um die Menge und Qualität der DNA in klinischen Proben zu beurteilen.

Die Beta-Globin-PCR wurde für diese Studie direkt in die BSGP5+/6+-PCR integriert (123, 124). Das bedeutet, dass in einer Reaktion gleichzeitig die virale HPV DNA und die humane Beta-Globin DNA amplifiziert wurden. Beta-Globin diente als Kontrolle, die zeigte, ob amplifizierbare DNA in der jeweiligen Probe vorhanden war. Wenn kein Beta-Globin Signal und gleichzeitig kein HPV Signal gefunden worden wären, so hätte dies zum Ausschluss der Probe aus der Studie geführt. Durch die Integration der Beta-Globin PCR in die BSGP5+/6+-PCR, wurden beide Reaktionen mit dem gleichen PCR-Programm und bei gleichen Bedingungen durchgeführt. Zusätzlich diente die Amplifizierung des Beta-Globin Gens zur Quantifizierung der Viruslast in den Tumoren (siehe 3.4.2.3.3, Methodenteil).

3.4.2.3 *MPG-Analyse*

3.4.2.3.1 Prinzip der Analyse

Die BSGP5+/6+-PCR Produkte werden denaturiert und an bead-gekoppelte Oligonukleotidsonden hybridisiert. Diese Reaktionen erfolgen in 96-Loch Platten, um 96 Proben gleichzeitig messen zu können. Jede Oligonukleotidsonde, die einen speziellen HPV-Typ repräsentiert, hat dabei ihre eigene Beadsorte. Die unterschiedlichen Färbungen der Beadsorten können später detektiert werden. Nach Übertragen der Proben auf 96-Loch Filterplatten wird die nicht-hybridisierte DNA entfernt: Die bead-gekoppelten Sonden sowie die hybridisierten PCR-Produkte bleiben jenseits des Filters, während die nicht-hybridisierte DNA durch den Filter hindurchgesaugt wird. Die an die bead-gekoppelten Sonden hybridisierten biotinylierten PCR-Produkte werden durch ein Streptavidin-Phycoerythrin (Strep-PE)-Konjugat fluoreszenzmarkiert. Nach weiteren Waschschritten können die Beads im Luminex Reader analysiert werden. Der Reader enthält zwei Laser: Einer der Laser erkennt die Beadsorte an ihrer internen Färbung, während der andere die Strep-PE-Reporterfluoreszenz auf den Beads quantifiziert. Pro PCR-Produkt Probe, also pro Loch der 96-Loch Platte, werden bei der Messung mindestens 100 Beads jeder Beadsorte erfasst. Das Ergebnis wird in „*median fluorescence intensity*“ (MFI) angegeben.

3.4.2.3.2 Kopplung der Oligonukleotidsonden an die Beads

Die Sonden wurden durch eine Carbodiimid-Kopplungsprozedur an carboxylierte Beads (COOH-Beads, xMAP™-Technology) gekoppelt. Jede Sonde erhielt dabei eine bestimmte Beadsorte. Bei jeder Sonden-Beadset Kombination wurden zunächst 200 µl der homogenen Bead-Lösung ($2 \times 1,25 \times 10^6$ Beads) in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und 2 min bei

13000 rpm zentrifugiert. Nachdem der Überstand abgenommen und verworfen wurde, wurden die Beads in 25 µl Kopplungspuffer resuspendiert. Es folgte die Zugabe von 1200 pmol der 5'Amino-Modifizier C-12 verknüpften Oligonukleotidsonden und 6 µl N-(3-dimethylaminopropyl)-N-ethylcarbodiimid (EDC) Lösung. Die Suspension wurde durch Vortexen gemischt und in der Dunkelheit für 30 min inkubiert, wobei die Suspension nach 15 min noch einmal gemischt wurde. EDC-Zugabe und Inkubation wurden wiederholt. Danach wurden die Beads einmal mit 1,0 ml 0,02% Tween 20-Lösung und einmal mit 1,0 ml 0,1% SDS gewaschen. Die Beads wurden jeweils 2 min bei 13000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Schließlich wurden die Oligonukleotid-gekoppelten Beads in 1x TE-Puffer resuspendiert und bei 4°C in der Dunkelheit gelagert.

3.4.2.3.3 Hybridisierung, Detektion, Cut-off Bestimmung und Viruslast

Nach der PCR wurden 10 µl jeder PCR-Reaktion in eine 96-Loch Platte pipettiert und mit 33 µl Hybridisierungslösung vermischt, die einen Mix aus 2000 sondengekoppelten Beads jeder Beadsorte in TMAC Hybridisierungspuffer enthielt. Danach wurden 7 µl TE-Puffer zugegeben, um ein Endvolumen von 50 µl zu erhalten und die Suspension vorsichtig gemischt. Dieser Ansatz wurde anschließend bei 95°C 10 min lang inkubiert und danach sofort 1 min lang auf Eis gestellt, um eine mögliche Renaturierung der PCR-Produkte zu verhindern. Die 96-Loch Platte wurde in einen Thermomixer gestellt, wo die Hybridisierungsreaktion 30 min bei 41°C stattfand.

Während der Hybridisierung wurden 100 µl Waschpuffer pro Loch auf die Filter-Waschplatte pipettiert und so 5 – 30 min bei RT inkubiert, um die Platten zu equilibrieren. Danach wurde der Waschpuffer abgesaugt und die Proben aufgetragen.

Alle Proben wurden mit einer Mehrkanalpipette auf die Filter-Waschplatte transferiert und mit 100 µl Blockingpuffer auf einer Waschstation gewaschen. Die Beads wurden anschließend mit 50 µl Detektionslösung (1:16 000 verdünntes Strep-PE) auf einem Schüttler resuspendiert und bei RT 30 min und 250 rpm in der Dunkelheit inkubiert. Danach wurden die Beads dreimal mit je 100 µl Blockingpuffer gewaschen und letztlich in 100 µl Blockingpuffer auf einem Schüttler resuspendiert. Die Messungen erfolgten schließlich in der 96-Loch Filterplatte im Luminex 100 Analyser.

Anhand der HPV16 Plasmid-Standard MFI-Werte, die für eine HPV16 Genomkopie pro 100 ng humaner Plazenta DNA erhalten wurden, wurde der Cut-off für HPV-positive Tumoren (HPV⁺) festgelegt. Wenn man davon ausgeht, dass eine humane Zelle ca. 6 pg DNA besitzt, entspricht dieser Cut-off demzufolge ca. 1 HPV Genomkopie pro 17 000 Zellen. Tumoren unterhalb dieses Cut-offs wurden als HPV-negativ gewertet (HPV⁻).

Die Bestimmung der Viruslast, d. h. die Quantifizierung der HPV16 DNA erfolgte mit Hilfe des Beta-Globin Nachweises (Schmitt *et al.*, in Bearbeitung). Für jede Reaktion wurden zunächst relative HPV16 Werte generiert (%), indem die gemessenen HPV16 MFI Signale durch das maximal gemessene HPV16 MFI Signal (MFI=3702) dividiert wurden. Anschließend wurden diese relativen Werte (%) durch das entsprechende Beta-Globin MFI Signal dividiert, um einen nicht-deskriptiven Wert der Viruslast zu erhalten (%HPV MFI/Beta-Globin MFI). Eine hohe Viruslast war durch einen vordefinierten Cut-off (0.0007 *units*) festgelegt, der für ‚Hochrisiko‘-HPV Typen so optimiert wurde, dass dadurch eine Differenzierung zwischen Zervixabstrichen mit normaler und abnormaler Zytologie möglich ist (Schmitt *et al.*, in Bearbeitung).

3.4.3 HPV16 quantitative real-time PCR

3.4.3.1 *Prinzip der Analyse*

Die Quantifizierung von DNA Sequenzen während der *real-time* PCR (qPCR) beruht auf der Messung von Fluoreszenz, die während eines PCR Zyklus erfasst wird. Für die qPCR in dieser Arbeit wurden Hybridisierungssonden verwendet. Die Sonden bestehen aus zwei Oligonukleotiden, von denen eines an seinem 3'-Ende mit einem Akzeptorfluorochrom und das andere an seinem 5'-Ende mit einem Donorfluorochrom versehen ist. Binden Akzeptor und Donor an die Ziel-DNA, d. h. an den amplifizierten DNA-Strang, so liegen zwischen beiden Oligonukleotidsonden nur wenige Nukleotide (1-5 nt) und das Akzeptormolekül wird dadurch in räumliche Nähe zum Donormolekül gebracht. Der Akzeptor wird mit Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt. Das emittierte Licht des Akzeptors regt daraufhin das Fluorochrom des Donors an, das ebenfalls an die Ziel-DNA gebunden hat. Schließlich wird die Menge des emittierten Lichts des Donors gemessen. Befinden sich Akzeptor und Donor nicht an der Ziel-DNA, d. h. nicht in dieser räumlichen Nähe zueinander, so wird auch kein emittiertes Licht gemessen.

Die Amplifizierung der DNA Fragmente während der qPCR erfolgt anfangs exponentiell bis die Reaktion in einem Plateau mündet. Gegen Ende werden Primer und Nukleotide knapp und auch die Polymerase hat aufgrund der hohen Temperaturen nur noch eine eingeschränkte Funktion, die PCR Reaktion wird gehemmt und kommt schließlich zum Stillstand. Für die Quantifizierung der DNA wird parallel die Sequenz mit einer bekannten Ausgangsmenge unterschiedlicher Konzentration amplifiziert. Anhand dieser Werte wird anschließend eine Standardkurve erstellt und schließlich die Kopienzahl der analysierten DNA in den Proben berechnet.

3.4.3.2 Durchführung

Die Primer für die qPCR wurden so gewählt, dass eine HPV16-spezifische Sequenz des E6 Gens amplifiziert wurde. Beta-Globin wurde co-amplifiziert und quantifiziert, um die DNA-Qualität der Proben zu sichern.

Die qPCR wurde in einem Light Cycler 480 von Roche durchgeführt. Die Amplifikationsbedingungen waren 10 min bei 95°C, gefolgt von 45 Zyklen bei 95°C und 10 s, 60°C und 30 s, 70°C und 1 s.

Die PCR fand in einem 10 µl Reaktionsansatz statt, bestehend aus 5 µl 2x Light Cycler 480 Sonden-Mastermix (Roche Diagnostics, Mannheim), jeweils 0,5 - 0,1 µM der entsprechenden Primer und jeweils 0,2 - 0,75 µM der Sonden, sowie jeweils 1 µl Tumor-DNA. Als Negativkontrollen wurden Ansätze mit allen PCR-Komponenten, aber ohne Tumor-DNA verwendet.

Die Standardkurve für Beta-Globin wurde durch eine Verdünnungsreihe von 100 bis 0,01 ng humaner Plazenta-DNA erstellt. Wenn man davon ausgeht, dass eine Zelle ~6 pg DNA enthält, kann die eingesetzte Beta-Globin DNA-Menge äquivalent in der Verdünnungsreihe bestimmt werden; 100 ng DNA entsprechen demzufolge 16666 Zellen und dementsprechend bei einem diploiden Genom ca. 30000 Beta-Globin Kopien.

Die Standardkurve für HPV16 wurde durch eine Verdünnungsreihe von 1 bis 10⁶ HPV16 Genomkopien pro 100 ng humaner Plazenta-DNA erstellt. Die Viruslast in den Tumoren wurde anschließend anhand der Standardkurve für HPV16 als Genomkopien pro Zelle bestimmt.

Die absolute Quantifizierung der Genom-Kopienzahl wurde dabei jeweils durch eine lineare Regressionsanalyse, die die Werte der unbekannten Probe gegen die Standardkurve mit bekannter Kopienzahl aufträgt, erreicht.

Da für die Tumoren dieser Arbeit durchschnittlich ein Tumoranteil von 50% bestimmt wurde, wurde der Cut-off für eine hohe Viruslast auf 0,5 Kopien/Zellen festgelegt.

3.5 HPV16 RNA Analysen

Nachdem durch die BSGP5+6+-PCR/MPG-Analyse die HPV-positiven Tumoren ermittelt wurden, wurden diese zusätzlich auf die biologische Aktivität des Virus durch den Nachweis von (i) onkogener RNA (E6*II und E6*I Transkripte) und (ii) viralen RNA-Mustern, die spezifisch für Zervixkarzinome gefunden wurden (39), analysiert.

3.5.1 RNA Extraktion

Die Extraktion der RNA aus dem Gewebe wurde mit Hilfe des RNeasy Mini Kits und der QIAshredder (Qiagen) durchgeführt. Das Prinzip des Kits beruht auf der Homogenisierung des Gewebes in Gegenwart von Guanidinium-Isothiocyanat-haltigem Puffer, der sogenannte Schutzgruppen um die RNA bildet und sie so vor dem Abbau durch z. B. RNasen schützt. Die RNA wurde anschließend mit Ethanol gefällt und an eine Silica-Gel Membran (QIAamp Spin Column) gebunden. Zusätzlich wurde ein DNA-Verdau durch DNase I (Qiagen) eingeschlossen, um eine ausschließliche Amplifikation der RNA zu gewährleisten. Dafür wurden pro Ansatz 10 µl der DNase I Stocklösung (Lagerung der Aliquots bei -20°C) und 70 µl RDD-Puffer vorsichtig gemischt, auf die QIAamp Säule aufgetragen und 15 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 350 µl RW1-Puffer hinzugegeben und 15 sec bei 8000x g zentrifugiert; der Durchfluss wurde verworfen.

Danach wurde die Membran mit den entsprechenden Puffern zweimal gewaschen. Da die RNA mit Ethanol gefällt wurde, der Alkohol aber Enzyme der NASBA-Reaktion hemmt, wurden die Proben kurz vor der Eluierung nochmals 5 min bei max. Geschwindigkeit und mit offenen Deckeln zentrifugiert, um ein Verdampfen des möglicherweise vorhandenen Restalkohols zu erreichen. Anschließend wurde die RNA zweimal mit 50 µl nukleasefreiem Wasser eluiert. Bis zur weiteren Verwendung wurde die RNA bei -80°C gelagert.

3.5.2 NASBA (*nucleic acid sequence based amplification*) und Hybridisierung

Um ein biologisch aktives Virus im Tumor nachweisen zu können, wurde in einer NASBA-Reaktion zunächst die E6*II und E6*I RNA (226[^]526) amplifiziert, um sie anschließend nach einer Hybridisierungsreaktion und dem Luminex 100 Analyser detektieren zu können. Anschließend wurden E6*-positive Tumoren auf die Expression der Transkripte E1C (880[^]2582), E1[^]E4 (880[^]3358) und L1 (3632[^]5639) untersucht, um die spezifischen viralen RNA-Muster zu generieren.

3.5.2.1 Prinzip der Analyse

Bei der NASBA handelt es sich um eine enzymatische Amplifikation von RNA, die bei isothermen Bedingungen abläuft (42°C). Für die Reaktion werden drei Enzyme, zwei spezifische Oligonukleotid-Primer, Nukleosidtriphosphate und entsprechende Pufferbedingungen benötigt.

Einer der Oligonukleotid-Primer (Primer 1) besitzt zusätzlich zu den Nukleotiden, die komplementär zur Ziel-RNA sind, an seinem 5'-Ende eine T7 RNA Polymerase-Promotorsequenz. Der zweite Oligonukleotid-Primer (Primer 2) besteht aus einer kurzen Sequenz, die identisch zu einer Sequenz der Ziel-RNA ist und stromaufwärts der Region liegt, an die der Primer 1 hybridisiert.

Bei den drei Enzymen, die bei der Reaktion benötigt werden, handelt es sich um die AMV-RT (*Avian Myeloblastosis Virus Reverse Transcriptase*), die *Escherichia coli* RNase H und die T7 RNA Polymerase.

Die Reaktion startet mit der Hybridisierung des Primer 1 an die einzelsträngige Ziel-RNA. Der Primer 1 besitzt an seinem 5'-Ende eine T7 Promotorsequenz. Die Reverse Transkriptase (AMV-RT) verlängert den Primer, in dem sie eine cDNA Kopie des RNA Templates erstellt. Resultat ist ein RNA/DNA Hybrid. Die RNase H erkennt dieses Hybrid als Substrat und hydrolysiert die RNA, wobei eine einzelsträngige cDNA zurückbleibt, an die der Primer 2 binden kann. Dieser Primer wird ebenso durch die AMV-RT verlängert. Durch die Verlängerung entsteht eine doppelsträngige DNA und letztlich wird so der T7-Promotor vervollständigt. Die T7 RNA Polymerase kann nun zahlreiche Kopien des RNA Transkripts herstellen, die alle ‚*antisense*‘ zur originalen Ziel-RNA-Sequenz sind. Jedes neusynthetisierte ‚*antisense*‘ RNA-Molekül selbst kann danach wieder als Template fungieren, an das zunächst Primer 2 bindet und am Ende der Reaktion wieder ein DNA-Intermediat mit funktionstüchtigem T7 Promotor steht. Auf diese Weise kann eine Vielzahl von RNA-Kopien entstehen: In 90 Minuten kann eine Amplifikation um das 10^6 bis 10^9 -fache erreicht werden. Im Anschluss an die NASBA-Reaktion wurden die Produkte an entsprechende Sonden hybridisiert und im Luminex 100 Analyser detektiert (siehe 3.5.2.3, Methodenteil).

3.5.2.2 Durchführung NASBA

Die für die NASBA benötigten Utensilien waren im Nuclisens EasyQ Kit für einen Ansatz aliquotiert, mit dem 16 Reaktionen durchgeführt werden konnten. Für einen Ansatz aus 16 Reaktionen wurden zunächst 16 µl der KCl Stocklösung mit 14 µl NASBA H₂O verdünnt, um eine KCl-Konzentration von 80 mM zu erhalten.

Um die Standardkurven zu generieren, wurden für alle *in vitro* transkribierten Kalibrator- und Wildtyp(wt)-Transkripte Verdünnungsreihen bis zu einer maximalen Verdünnung des Faktors 10^1 hergestellt. Die Ausgangskonzentrationen der Transkripte betrug 10^9 oder 10^8 . In den 18 μ l NASBA H₂O waren zusätzlich 2 ng tRNA als Träger-RNA hinzupipettiert worden, um einen effizienten Transfer der Transkripte zu gewährleisten. Die Verdünnungsreihe erfolgte nach dem in Abbildung 3-2 dargestellten Schema.

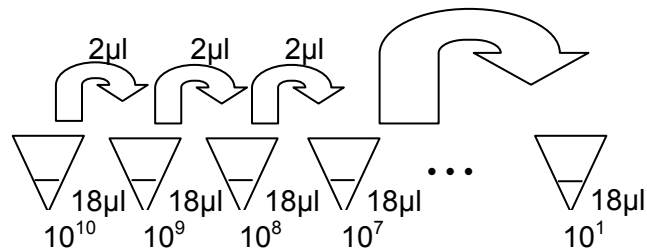


Abb. 3-2 Schema der Verdünnungsreihe für die Transkripte.

Für jedes Transkript wurde eine eigene *Working Solution* hergestellt. Die *Working Solution* für einen Ansatz (16 Reaktionen) mit einem Gesamtvolumen von 20 μ l beinhaltete die folgenden Reagenzien: 2,5 μ l (40 pmol/ μ l) Primer 1; 2,5 μ l (40 pmol/ μ l) Primer 2; 10,2 μ l NASBA H₂O und 4,8 μ l der entsprechenden Kalibrator (Q-RNA) Verdünnung.

Schließlich wurde ein Mastermix für jedes Transkript separat hergestellt. Hierfür wurde der im Kit enthaltene lyophilisierte Reaktionsmix mit 64 μ l des entsprechenden ‚*Reagent diluent*‘ versetzt und durch Vortexen gelöst. Zu dem gelösten Reaktionsmix wurden letztlich 24 μ l der KCl-Lösung und 8 μ l der *Working Solution* gegeben, um den Mastermix zu erhalten. Für die Enzymlösung wurden für einen Ansatz (16 Reaktionen) 53,5 μ l ‚*Enzyme diluent*‘ zum lyophilisierten Enzymmix hinzupipettiert, bei RT ca. 20 min inkubiert und sehr vorsichtig gelöst.

In der Zwischenzeit wurden die Reaktionsansätze vorbereitet: Jeweils 5 μ l des Mastermixes wurden in Reaktionsgefäße (8-tube strip, Nerbe plus) vorgelegt und schließlich je 2,5 μ l der wt-RNA Verdünnungsreihe, der Tumor-RNA oder H₂O als Negativkontrolle hinzupipettiert, gemischt und die Reaktionsgefäße mit Deckel verschlossen.

Die Proben wurden nun in einen Eppendorf Mastercycler mit beheiztem Deckel (60°C) gestellt und zunächst 2 min bei 65°C zur Denaturierung der Sekundärstrukturen inkubiert. Während dieser Inkubationszeit wurden in separate Deckel der Reaktionsgefäße jeweils 3 μ l der Enzymlösung pipettiert. Mit Beginn des Abkühlens auf 41°C wurden die Deckel der Reaktionsgefäße ausgetauscht, so dass jeder Reaktionsansatz mit Enzymlösung versehen wurde. Die Enzymlösung gelangte durch kurzes Zentrifugieren zunächst in das Reaktionsgefäß, durch kurzes und vorsichtiges Schnippen wurden die Proben gemischt, kurz

abzentrifugiert und schließlich wieder ins Gerät bei 41°C zurückgestellt. Die Reaktion lief bei 41°C 90 min lang. Die NASBA Produkte wurden anschließend bei -20°C gelagert und die Reaktion dadurch gleichzeitig gestoppt.

3.5.2.3 Durchführung Hybridisierung

Die durch die NASBA amplifizierten RNA Transkripte wurden schließlich durch Bead-gekoppelte Oligonukleotidsonden und dem Luminex Analyser detektiert. Die Kopplung der RNA-spezifischen Sonden an die Beads wurde auf gleiche Weise durchgeführt wie die Kopplung der MPG Sonden (siehe 3.4.2.3.2, Methodenteil). Während der Hybridisierung wurden ausschließlich DNase/RNase-freie Lösungen verwendet.

Zunächst wurde jeweils 1 µl der NASBA Produkte in eine 96-Loch Platte vorgelegt. Anschließend wurden jeweils 49 µl Hybridisierungslösung hinzupipettiert, die sich aus 33 µl 1,5 M TMAC-Puffer, 75 mM Tris-HCl, pH 8,0, 6 mM EDTA, pH 8,0, 1,5 g/l Sarkosyl, 16 µl TE-Puffer und einem Mix aus je 2000 Sonden-gekoppelter Beads pro Sorte zusammensetzte. Zur Denaturierung wurde die Platte anschließend 5 min bei 95°C inkubiert und danach 1 min auf Eis inkubiert, um eine Renaturierung zu verhindern. Die Hybridisierung erfolgte schließlich in einem Schüttelinkubator bei 41°C 30 min lang.

Die Reaktionsansätze wurden auf eine Waschplatte überführt und mit je 100 µl Waschpuffer (1x PBS/0,02% Tween) gewaschen. Anschließend wurden jeweils 50 µl der Detektionslösung (2 M TMAC, 75 mM Tris-HCl, pH 8,0, 6 mM EDTA, pH 8,0, 1,5 g/l Sarkosyl und 1:1000 verdünntes Strep-PE) hinzugegeben und bei RT 20 min schüttelnd inkubiert. Die Platte wurde erneut zweimal mit je 100 µl Waschpuffer gewaschen. Zur Analyse im Luminex 100 Analyser wurden die Beads schließlich in je 100 µl Waschpuffer resuspendiert.

3.5.2.4 Cut-off Bestimmung und Quantifizierung

Die gemessenen MFI-Werte der Reaktionen ohne RNA Transkripte während der Hybridisierung wurden als Hintergrundsignale herangezogen und von den Signalen der Reaktionen mit RNA Transkripten subtrahiert. Die so erhaltenen MFI-Werte > 3 wurden als positive Reaktionen gewertet.

Für eine Quantifizierung der viralen RNA Transkripte wurden in jeder Reaktion entsprechende Kalibrator-Transkripte kompetitiv co-amplifiziert. Für die Erstellung externer Standardkurven wurden die verschiedenen Konzentrationen von *in vitro* transkribierter wt-RNA mit der Q-RNA co-amplifiziert. Die Quotienten dieser MFI-Werte aus einem Reaktionsansatz gaben letztlich Aufschluss über die eingesetzte Menge an RNA Transkripten (25 bis 25x10⁵). Anhand dieser Quotienten (wt-RNA MFI vs. Q-RNA MFI) wurde

schließlich die Kopienzahl der in den Tumorproben enthaltenen viralen RNA Transkripte bestimmt. Die Quantifizierung der viralen Transkripte erfolgte nur mit den MFI-Werten oberhalb des Cut-offs (MFI=3), das heißt nur für diese MFI-Werte wurde der Quotient MFI-Signale der Proben-RNA und der Kalibrator-RNA bestimmt.

Für die viralen RNA-Muster lag ein vordefinierter Cut-off vor. Dieser basierte auf der Differenzierung zwischen Zervixabstrichen mit normaler oder niedriggradiger und mit abnormaler Zytologie oder Zervixkarinomen (39) und wurde so auch in dieser Arbeit angewandt.

3.5.2.5 Die viralen RNA-Muster

Nachdem alle MFI-Werte > 3 der Tumorproben mit den entsprechenden MFI-Werten der Q-RNA normalisiert wurden, wurden für die E6*-positiven Tumoren die viralen RNA-Muster bestimmt: Es wurden Quotienten gebildet aus (i) dem E6*-Verhältnis ($E6^* \text{ MFI vs. } Q\text{-}E6^* \text{ MFI}$) und dem E1^{E4}-Verhältnis ($E1^E4 \text{ MFI vs. } Q\text{-}E1^E4 \text{ MFI}$), um das RNA Muster-1 und (ii) dem E1C-Verhältnis ($E1C \text{ vs. } Q\text{-}E1C$) und dem L1-Verhältnis ($L1 \text{ vs. } Q\text{-}L1$), um das virale RNA Muster-2 zu erhalten. Die Tumoren, bei denen das Verhältnis aus den quantitativen E6*-Werten vs. E1^{E4}-Werten > 1,5 betrug oder bei denen das Verhältnis aus den quantitativen E1C-Werten vs. L1-Werten > 0,003 betrug, wurden als Tumoren mit aktiver HPV16-Beteiligung deklariert. Diese Tumoren zeigten die für Zervixkarzinome (CxCa) und Zervixabstriche mit hochgradigen Läsionen typischen viralen RNA-Muster und wurden daher in dieser Arbeit mit RNA⁺/CxCa⁺ abgekürzt.

RNA von gesunder Mundschleimhaut (HPV DNA-negativ) und von einem HPV-negativen Tumor dienten als Negativkontrollen. Die E6*-negativen Tumoren wurden zusätzlich auf die Expression des konstitutiv exprimierten zellulären Ubiquitin C (Ubc) Gens untersucht.

3.6 Gewebechiptechnologie

Bei der Tumorentstehung sind zahlreiche Gene und Signalwege beteiligt, die die Proliferation, die Apoptose und die Differenzierung von Zellen kontrollieren. Mit Hilfe immunhistochemischer Färbungen können diese Proteine durch entsprechende Antikörper am Gewebeschnitt nachgewiesen werden. Die Gewebechiptechnologie ermöglicht dabei den Nachweis einer Vielzahl von Biomarkern in kurzer Zeit bei einer großen Anzahl von Tumoren.

3.6.1 Gewebeauswahl und HE-Färbung

Für den Gewebechip (*Tissue Microarray*, TMA) wurden zunächst zu allen 199 Patienten aus den elektronischen Patientenakten alle in Formalin-fixierten und in Paraffin-eingebetteten Biopsien herausgeschrieben. Zu diesen Biopsien wurden – falls vorhanden – die entsprechenden HE-Färbungen im Pathologischen Institut herausgesucht. Die HE-Färbungen wurden von der Pathologin Dr. med. Christa Flechtenmacher begutachtet und die Tumorareale von ihr unter dem Mikroskop mit einem Stift markiert. Nun wurden zu allen markierten HE-gefärbten Gewebeschnitten die entsprechenden Paraffinblöckchen, sowie diejenigen Paraffinblöckchen herausgesucht, zu denen keine HE-Färbungen gefunden werden konnten. Von diesen musste nun am Mikrotom jeweils ein 4 µm dicker Schnitt angefertigt, auf Objektträger aufgezogen, über Nacht bei 37°C getrocknet und anschließend mit Hämalaun und Eosin gefärbt werden. Die HE-Färbung erfolgte nach dem gleichen Protokoll wie für die Gefriergewebeschnitte (siehe 3.3, Methodenteil), allerdings war es erforderlich zu Beginn des Protokolls einen Entparaffinierungsschritt mit Xylol sowie einen Rehydrierungsschritt mit Ethanol (100%, 96%, 70% EtOH, vergällt) durchzuführen.

Für 11/199 Patienten dieser Arbeit konnten keine für die Analyse geeigneten Paraffinblöckchen gefunden werden. Zu anderen Patienten dieser Studie standen mehr als ein Paraffinblöckchen des entsprechenden Tumors zur Verfügung. Nachdem für die 188 Patienten alle Paraffinblöckchen sowie für mehrere gesunde Schleimhäute HE-Färbungen vorlagen, konnten die restlichen repräsentativen Areale auf den gefärbten Schnitten markiert und anschließend der Gewebechip erstellt werden.

3.6.2 TMA-Anfertigung

Durch die Vorauswahl an Geweben und nach der Markierung der repräsentativen Gewebeareale ergaben sich für die 188 Patienten inklusive 5 gesunden Schleimhäuten als Kontrollen insgesamt 231 Paraffinblöckchen, von denen nun die entsprechenden Areale in einen einzigen leeren Paraffinblock überführt werden mussten.

Mit Hilfe des AlphaMetrix Stanzgerätes wurde zunächst an die entsprechende Position im leeren Paraffinblock ein Loch (0,6 mm im Durchmesser und 3mm lang) eingestantzt. Anschließend wurde aus einem Gewebeblöckchen ein im Durchmesser von 0,6 mm größer und 3 mm langer Stanzzylinder aus dem repräsentativen Areal entnommen und direkt in das gleichgroße Loch des leeren Paraffinblocks eingesetzt. Darauf folgte in 0,8 mm Entfernung das nächste Loch, in welches ein nächster Stanzzylinder einer anderen Biopsie eingefügt werden konnte. Die Koordinaten der Einstanzpositionen wurden durch zwei digitale Mikrometerschrauben festgelegt.

Es wurden in horizontaler Richtung 21 und in vertikaler Richtung 11 Stanzbiopsien jeweils mit einem Abstand von 0,8 mm nebeneinander eingesetzt, so dass letztlich ein Rechteck mit allen 231 Stanzen der zu untersuchenden Biopsien entstand. Um bei der Auswertung des TMAs die Orientierung behalten zu können, wurde jeweils horizontal nach der 13. Stanze und vertikal nach der 7. Stanze eine Lücke von 1,6 cm freigelassen (s. Abbildung 3-3).

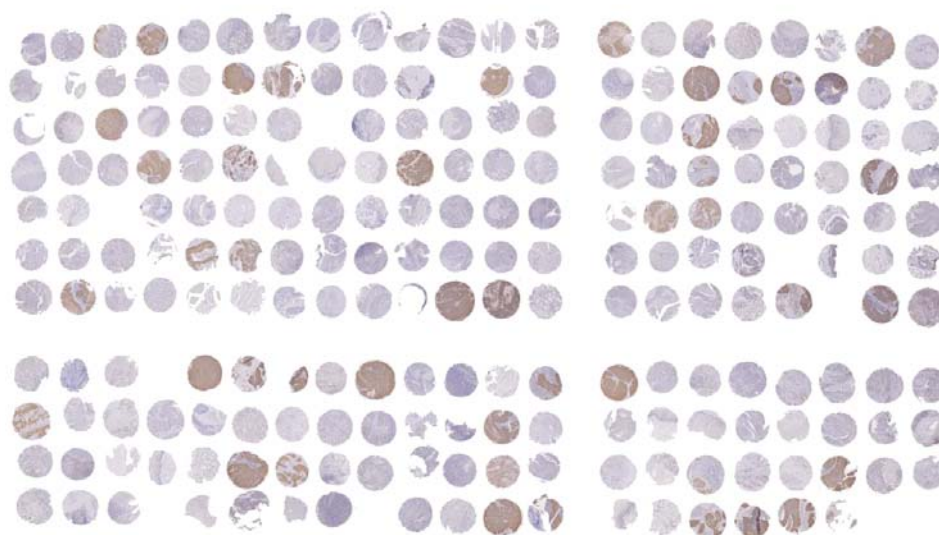


Abb. 3-3 Anordnung der Stanzbiopsien am Gewebechip.

p16^{INK4a} IHC an TMA018 mit Schnittnummer 50.

Zum TMA wurde ein Duplikat angefertigt, um die Anzahl der Tumorstanzen pro Patient zu erhöhen. Fehlte eine Tumorstanze auf dem einen TMA, so konnte ggf. die Tumorstanze des anderen TMAs ausgewertet werden. Nachdem die TMAs fertig gestanzt waren, wurden die Paraffinblöcke für ca. 1 h bei 37°C inkubiert, um die Haftung des Gewebes an das Paraffin zu erhöhen. Außerdem konnten nach dem Erwärmen durch leichten Druck mit einer glatten, ebenen Oberfläche auf den Block die Gewebestanden auf eine annähernd gleiche Ebene gebracht werden. Dadurch hatte man beim Schneiden des TMAs weniger Gewebeverluste.

3.6.3 Schneiden des Gewebechips

Der TMA wurde bei einer Umgebungstemperatur von -20°C im Kryostat geschnitten, nachdem der Paraffinblock mit Gewebekleber im Gerät fixiert wurde.

Von dem TMA wurden insgesamt ca. 150 brauchbare je ~4 µm dicke Schnitte hergestellt, die zunächst in ein 40°C warmes Wasserbad überführt wurden und anschließend auf silanisierte Objektträger der Schnitreihenfolge entsprechend aufgezoogen wurden.

Die Schnitte wurden über Nacht bei 37°C getrocknet.

3.7 Fluoreszenz In-Situ Hybridisierung

Als weiteres direktes Nachweisverfahren von HPV16 DNA im Tumor wurde die Fluoreszenz *In-Situ* Hybridisierung (FISH) eingesetzt. Um dabei möglichst effizient zu sein, wurde erneut der Gewebechip eingesetzt. Demzufolge wurden alle 188 Tumoren in nur einer Reaktion auf das Vorhandensein von HPV16 DNA untersucht.

Die Analyse wurde im Labor ‚*Cancer (cyto)Genetics*‘ unter der Leitung von Ernst-Jan Speel, in Maastricht/Niederlande durchgeführt. Diese Methodik ist bei den Kollegen seit Jahren etabliert.

3.7.1 Vorbereitung der Schnitte

Die 4 bis 5 µm dicken Schnitte des Gewebechips wurden auf gleiche Weise hergestellt wie für die immunhistochemischen Analysen (siehe 3.6.3, Methodenteil).

Zunächst wurde der TMA bei 80°C 30 min lang auf einer Heizplatte gebacken. Anschließend erfolgte die Entparaffinierung und Rehydrierung der Gewebe: 3x 10 min Xylol, 2x 5 min 100% Ethanol, 2x 5 min 96% Ethanol und 1x 5 min Methanol. Nach ca. 10 min Lufttrocknen erfolgte das Blocken der endogenen Peroxidasen in 85% Ameisensäure und 0,3% H₂O₂ bei RT. Anschließend wurde der TMA kurz in saurem Ethanol gewaschen (70% EtOH/0,01% HCl). Danach wurde das Gewebe in einer aufsteigenden sauren Alkoholreihe dehydriert, 5 min 70% EtOH/0,01% HCl, 2x 5 min 96% EtOH, 2x 5 min 100% EtOH und luftgetrocknet.

Die Schnitte wurden nun in vorgewärmter 1 N Natriumthiocyanat (NaSCN) Lösung bei 80°C im Wasserbad inkubiert, anschließend erneut mit saurem Alkohol gewaschen, in aufsteigender saurer Alkoholreihe dehydriert und luftgetrocknet.

Der proteolytische Verdau erfolgte schließlich mit Pepsin (0,4g/100ml 0,02 N HCl; 800 – 1200 U/mg, Sigma) bei 37°C für 10 min im Wasserbad. Diese Vorbehandlung der Schnitte (Inkubation in Ameisensäure, H₂O₂ und NaSCN) in Kombination mit dem proteolytischen Verdau entfernt nahezu alle Proteine in den Zellkernen und dem Zytoplasma. Daher ist durch diese Behandlung die Hybridisierungseffizienz sowie die Erhaltung der Morphologie während der FISH deutlich verbessert (125).

Nach dem Verdau wurden die Schnitte 5 min mit 0,01 N HCl gespült und anschließend in einer aufsteigenden sauren Alkoholreihe dehydriert.

Nachdem die Schnitte an der Luft getrocknet waren, wurden die Gewebe 15 min bei RT in 1% Paraformaldehyd/1x PBS fixiert, anschließend 3x 5 min mit 1x PBS und 3x 10 sec mit ddH₂O gespült. Danach erfolgte eine erneute Dehydrierung in aufsteigender Alkoholreihe (5 min 70%, 2x 5 min 96%, 2x 5 min 100% EtOH) und das Trocknen der Schnitte an der Luft.

3.7.2 Vorbereitung der Hybridisierungssonden

Die biotinylierten HPV16 DNA-Sonden wurden zur Hybridisierung mit einem Dextransulfat-Hybridisierungsmix versetzt. Die durch das Dextransulfat erreichte Viskosität der Lösung bewirkte eine Immobilisierung der bindungsfähigen DNA-Fragmente auf dem Zielpräparat und die Hybridisierungseffizienz war damit erhöht.

Es wurden jeweils zu 1 ng/µl markierter HPV16 DNA-Sonde 60% Formamid, 2x SSC, 10% Dextransulfat und 50x Lachssperma DNA hinzupipettiert, gut gemischt und anschließend ca. 15 µl des Hybridisierungsmixes pro TMA pipettiert.

3.7.3 Denaturierung und Hybridisierung

Um die Hybridisierung der Sonde an die Ziel-DNA zu ermöglichen, mussten zuvor durch Denaturieren Einzelstränge erzeugt werden. Die Denaturierung der Sonden- und Ziel-DNA erfolgte dabei simultan: Auf das Zielgewebe wurden ca. 15 µl der vorbereiteten Sonde aufgetragen und anschließend mit einem Deckglas (60x36 mm) bedeckt, um ein Verdunsten des geringen Volumens zu vermeiden. Die so vorbereiteten Objektträger wurden daraufhin auf einer 80°C heißen Heizplatte 5 min inkubiert.

Für die Hybridisierung wurde eine feuchte Edelstahl-Kammer vorbereitet, indem Tücher mit einer Formamid-Lösung (60% Formamid/2x SSC) getränkt wurden und in der Kammer platziert wurden. Diese sollten für die Dauer der Hybridisierung das feuchte Milieu aufrechterhalten und ein Austrocknen der Sondenlösung verhindern. Die Objektträger wurden in die Kammer gelegt, die Hybridisierung erfolgte daraufhin über Nacht in einem Inkubator bei 37°C.

3.7.4 Waschen

Nach erfolgter Hybridisierung wurden die Präparate von überschüssiger Sondenlösung und unspezifisch gebundenen Nukleotiden durch verschiedene Waschschrte befreit.

Die Objektträger wurden der feuchten Kammer entnommen und kurz in die erste 42°C warme Waschlösung (2x SSC/0,05% Tween) gedippt, um die Deckgläser vorsichtig mit einer Pinzette entfernen zu können. Danach erfolgten die Waschschrte, 2x 5 min 2x SSC/0,05% Tween bei 42°C in einem Schüttelwasserbad, 2x 5 min 0,1xSSC bei 60°C und 2x 5 min 4x SSC/0,05% Tween bei RT.

3.7.5 Detektion der biotinmarkierten DNA-Sonden

Die gewaschenen Objektträger wurden in eine feuchte Kunststoffkammer gelegt und es wurden auf den hybridisierten Bereich jeweils ca. 100 µl der verdünnten Detektionslösungen nach folgendem Protokoll aufgetragen:

- 30 min Inkubation bei 37°C mit Avidin-Peroxidase (anti-Biotin; 1:200 in NFDM-Lösung verdünnt; 5% *non fat dry milk* (NFDM; Milchpulver) in 4x SSC)
- 3x 5 min waschen in 4x SSC/0,05% Tween
- 30 min Inkubation bei 37°C mit biotinyliertem Anti-Avidin in NFDM-Lösung (1:100 in NFDM-Lösung verdünnt)
- 3x 5 min waschen in 4x SSC/0,05% Tween
- 30 min Inkubation bei 37°C mit Avidin-Peroxidase (anti-Biotin; 1:100 in NFDM-Lösung verdünnt)
- 3x 5 min waschen in 4x SSC/0,05% Tween

Anschließend sollten die Signale mittels Rhodamin-gekoppeltem Tyramid verstärkt werden. Dafür wurden die Schnitte 10 min lang bei 37°C mit 100 µl der folgenden Lösung inkubiert:

- 1,0 ml PBS/Imidazol (pH 7,6; vorgewärmt auf RT)
- 10 µl 0,01% H₂O₂ in PBS (1 µl 30% H₂O₂ in 300 µl PBS)
- 10 µl Tyramid (Molecular Probes)

Anschließend wurden die Schnitte 3x 5 min in 4x SSC gewaschen und in einer neutralen Alkoholreihe dehydriert.

3.7.6 Einbetten der Präparate

Um die sichtbare rote Farbe des Rhodamin-Fluorochroms (TSA-Kit) nicht mit anderen Farben zu überlagern, wurde mit dem Einbettmedium Vectashield/DAPI eingebettet, wodurch eine sichtbare blaue Gegenfärbung der Zellkerne erreicht wurde. Vectashield verhindert dabei ein vorzeitiges Ausbleichen der Fluorochrome.

Das Eindeckmedium wurde als Tropfen auf den Objektträger aufgetragen und mit einem großen Deckglas (60x36 mm) luftblasenfrei überdeckt.

3.7.7 Auswertung

Nach erfolgter Detektion der Hybridisierung wurden die Signale durch Fluoreszenzanregung unter einem Fluoreszenz-Mikroskop sichtbar gemacht und ausgewertet. Das Fluoreszenzmikroskop vom Typ Olympus BX-50F verfügte neben der Fluoreszenzlampe über verschiedene Filter zur Einzel-Anregung von DAPI und dem Rhodamin. In den meisten Fällen waren die Rhodamin-Signale stark genug und konnten so im WU-Filter gemeinsam mit der DAPI-Kernfärbung dargestellt werden. Bei Präparationen mit schwacher Signalintensität diente der Schmalband-Rhodamin-Filter (NIBA) zur genaueren Signalbestimmung.

Da die Hintergrundsignale zum Teil sehr hoch waren, wurden durch Ernst-Jan Speel für die Auswertung der FISH die Ergebnisse der p16^{INK4a}-Immunhistochemie herangezogen. Die TMAs wurden durch zwei Personen unabhängig von einander ausgewertet. Es wurden positive Signale sowie der physikalische Status des Genoms (granuläre oder punktierte Signale) dokumentiert. Die Ergebnisse wurden letztlich als Score dargestellt: 0, HPV16-negativ; 1, HPV16-positiv und integriertes Genom; 2, HPV16-positiv und episomales Genom.

3.8 Immunhistochemie (IHC)

Die 231 Gewebestanzten auf dem TMA wurden mit vier verschiedenen Primärantikörpern (Anti-p16^{INK4a}, Anti-pRb, Anti-Cyclin D1 und Anti-p53) immunhistochemisch gefärbt und durch zwei verschiedene Detektionssysteme (ImmPRESSTM Detection System und *Tyramid Signal Amplification* – TSATM – System) analysiert.

Es wurden je Primärantikörper, Detektionssystem und TMA zwei Schnitte angefärbt: Jeweils ein Schnitt, der in der Schnittreihenfolge weiter vorn lag und ein in der Schnittreihenfolge späterer Schnitt. Fehlte eine Stanze auf dem einen Schnitt oder traten Unklarheiten bei der Auswertung auf, so konnte der andere Schnitt an der entsprechenden Position häufig Aufschluss über die Färbung geben. Schnitte, an denen beide Detektionssysteme angewandt werden sollten, waren benachbart, um eine vollständige Auswertung der IHC zu gewährleisten.

3.8.1 Färben der Schnitte

Zunächst mussten die Schnitte durch Xylol entparaffiniert und durch eine absteigende Alkoholreihe (100%, 96%, 70%) rehydriert werden. Der Inaktivierungs-Schritt der endogenen Peroxidasen wurde direkt in die Rehydrierung eingebaut (3% H₂O₂ in 70% EtOH).

Nach der Entparaffinierung wurden die Gewebeschnitte je nach Antikörper (s. Tabelle 3-1) entweder 30 min in 10 mM Citratpuffer (pH 6,0) oder 10 min in DAKO Target Retrieval

Solution, pH 9,0, im Dampfgarer gekocht. Nach dem Kochen wurden die Schnitte ca. 40 min bei RT abkühlt.

Anschließend wurden die Schnitte 5 min in 1x PBS gewaschen. Während des Waschens wurden die Gewebe auf dem Objektträger mit einem Fettstift umrandet, um ein Auslaufen der Antikörper- und Substratlösungen zu verhindern. Für die TSA-Färbungen wurden die Schnitte zusätzlich 5 min mit 1x TNT Puffer auf einem Schüttelinkubator behandelt.

Um unspezifische Bindungen des Primärantikörpers zu verhindern, wurden die Objektträger in eine feuchte Kammer überführt, ein paar Tropfen Pferde-Serum (Ready-to-Use, ImmPRESS) oder TNB (TSA™) auf den Schnitt aufgetragen und 20 Minuten bzw. 1 Stunde inkubiert. Anschließend wurde der Primärantikörper in unterschiedlichen Verdünnungen aufgetragen (siehe Tabelle 3-1).

Nach der Inkubation des Primärantikörpers wurden die Schnitte zweimal 5 Minuten in 1x PBS (ImmPRESS) oder in TNT-Puffer (TSA™) gewaschen und anschließend mit den zwei unterschiedlichen Detektionssystemen behandelt.

Tab. 3-1 Färbebedingungen für die entsprechenden Detektionssysteme und Primärantikörper.

Primärantikörper	p16 ^{INK4a}	pRb	Cyclin D1	p53
Verdünnung*	1:100	1:35	1:10	1:500
Antigen-Retrieval	Citratpuffer pH 6,0 Dampfgarer 30min	Citratpuffer pH 6,0 Dampfgarer 30min	Dako Puffer pH 9,0 Dampfgarer 10min	Citratpuffer pH 6,0 Dampfgarer 30min
Inkubation	RT, 60min	RT, 60min	RT, 30min	4°C, ÜN
ImmPRESS-System	x	x	x	x
TSA-System	x	-	x	x

* Verdünnungen der Antikörper in 1x PBS für das ImmPRESS System und in TNB für das TSA-System

3.8.1.1 ImmPRESS™ Detektionssystem

Bei dem ImmPRESS™-System ist der Sekundärantikörper mit dem Enzym Peroxidase gekoppelt. Durch das DAB-Substratkit für Peroxidase können auf diese Weise letztendlich die Antigene detektiert werden.

Es wurden wenige Tropfen Sekundärantikörper (Anti-Maus, Ready-to-Use, ImmPRESS™) pro Schnitt aufgetragen und die Schnitte in der feuchten Kammer 20 Minuten bei RT inkubiert.

Nachdem zweimal 5 min mit 1x PBS gewaschen wurde, erfolgte die Zugabe der DAB-Detektionslösung (1 Tropfen Puffer-Stock, 2 Tropfen DAB, 1 Tropfen Peroxidase-Substrat in

2,5 ml ddH₂O). Die Entwicklungszeit der Färbungen variiert stark und muss stets beobachtet werden, um eine Überentwicklung zu vermeiden. Nachdem eine ausreichende Entwicklung der Färbung erreicht war, wurde die Substratlösung abgesaugt und die Schnitte 3 min in 50 mM NaHCO₃ inkubiert. Nach einem kurzen ddH₂O-Bad wurden die Objektträger kurz in Hämalaun gestellt und anschließend 10 min mit Leitungswasser gebläut. Danach wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Ethanolreihe (70%, 96%, 100%) und Xylol dehydriert und mit Eukitt sowie einem Deckglas eingedeckt.

3.8.1.2 TSATM-Detektionssystem

Die *Tyramide-Signal-Amplification*TM (TSATM) ist eine patentierte Technologie entwickelt von Perkin Elmer und bewirkt eine Amplifikation der chromogenen Signale während der immunhistochemischen Färbung. Das Detektionssystem wurde für die Färbungen mit den Primärantikörpern Anti-p53, Anti-p16^{INK4a} und Anti-Cyclin D1 verwendet (siehe Tabelle 3-1).

Durch die Amplifikation der Signale können diejenigen Proteine sichtbar werden, die nur in geringem Maße exprimiert werden, während durch das ImmPRESSTM-System nur überexprimierte Proteine sichtbar werden. Auf diese Weise kann bei der Färbung der Proteine p53, p16^{INK4a} und Cyclin D1 zwischen einer normal-niedrigen Expression und einem Verlust des jeweiligen Proteins differenziert werden.

Abbildung 3-4 zeigt den Unterschied der beiden Detektionssysteme. Das biotinylierte Tyramid bindet kovalent an Tyrosinreste. Die Straptavidin-gekoppelte Peroxidase kann anschließend an das Biotin des Tyramids binden, wodurch die Signalverstärkung erfolgt. Ein Beispiel für die unterschiedliche Visualisierung des Proteinexpressionslevels zwischen Standard-IHC und TSA-IHC ist in Abbildung 3-5 gezeigt.

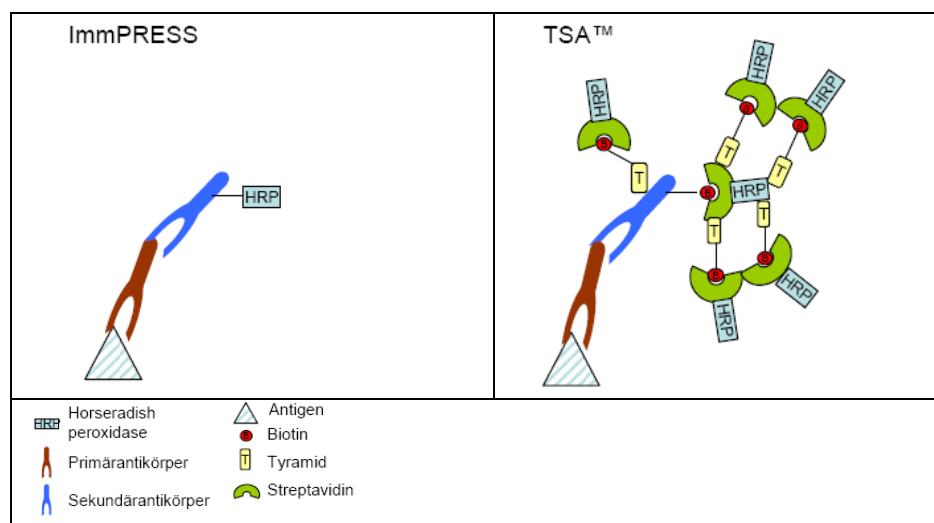


Abb. 3-4 Darstellung der verschiedenen Detektionssysteme.
Erklärung im Text.

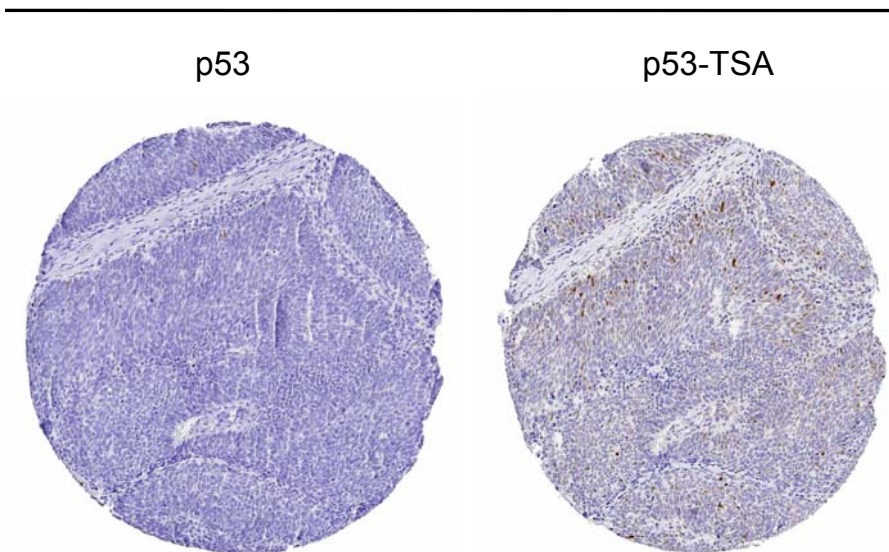
RNA⁺/CxCa⁺ OPSCC

Abb. 3-5 Beispiel für die unterschiedliche Visualisierung des p53-Expressions-levels zwischen Standard-IHC (links) und der IHC mit Tyramid Signalverstärkung (TSA-IHC, rechts). Dieser Tumor bekam nach Auswertung der Standard-IHC den Score 0 (keine Färbung); nach Auswertung der Tyramid-Färbung wurde der Tumor mit Score 1 (leichte Färbung analog zur Schleimhaut) bewertet. Aufnahmen jeweils mit 10-fach Objektiv.

Nach dem Waschen der Schnitte, wurde ein biotinylierter Sekundärantikörper (Anti-Maus, 1:200 in TNB Puffer) aufgetragen und 1 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde zweimal 5 min mit TNT Waschpuffer gewaschen. Danach wurde das Streptavidin-HRP-Konjugat (1:100 in TNB) aufgetragen und 30 min bei RT inkubiert. Es folgte erneut ein zweimaliges Waschen mit TNT-Waschpuffer. Nun wurde die Tyramidverdünnung (1:200 in Amplifikationslösung) aufgetragen und exakt 10 min inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte zweimal mit TNT Waschpuffer gewaschen und das Streptavidin-HRP-Konjugat wurde erneut für 30 min bei RT aufgetragen. Schließlich wurde erneut zweimal mit TNT-Waschpuffer gewaschen und es wurde nach gleichem Protokoll wie für das ImmPRESSTM-System die DAB-Detektionslösung auf die Schnitte pipettiert, die Schnitte anschließend gewaschen, mit Hämalaun gefärbt, dehydriert und eingedeckt.

3.8.2 Auswertung

Die verschiedenen immunhistochemischen Färbungen an dem Gewebechip wurden mit Hilfe des Hamamatsu Scanners digitalisiert und anschließend mit der entsprechenden Software (Ndpi-Viewer, Hamamatsu) betrachtet und ausgewertet. Auf diese Weise wurden die Tumoren am PC-Monitor ausgewertet ohne dabei die Übersicht über den TMA verlieren zu können. Außerdem konnten durch Hinein- bzw. Hinauszoomen des Bildes die verschiedenen Objektive eines Mikroskops nachgestellt werden, so dass auch die Betrachtung von stark

vergrößerten Arealen gelang. Als Referenz wurde die entsprechende Färbung der gesunden Schleimhaut herangezogen (siehe Abbildung 3-6), die Tumoren erhielten daraufhin je nach Färbung entsprechende Scores (siehe Tabelle 3-2): 0, es waren keine Braunfärbung der Zellkerne sichtbar; 1, leichte Färbung, d. h. einige Kerne der Tumorzellen wiesen eine bräunliche Färbung auf, während andere nicht gefärbt waren; 2, starke Färbung, d. h. viele Kerne der Tumorzellen wiesen eine starke Braunfärbung auf. Die Auswertung erfolgte durch mindestens zwei Personen, die unabhängig von einander und ohne Kenntnis des HPV-Status die Scores für die jeweiligen Tumoren dokumentierten. Die Scores wurden anschließend verglichen und bei Diskordanz wurde sich mit einer dritten unabhängigen Person auf ein Ergebnis festgelegt.

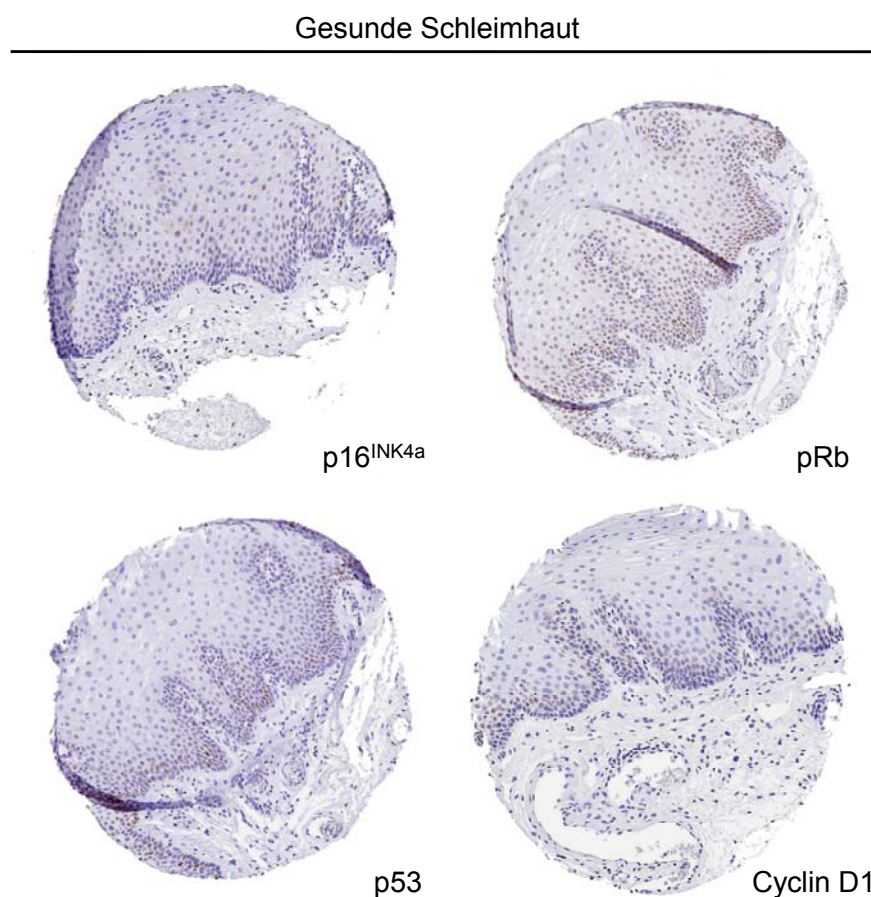


Abb. 3-6 Typisches Proteinexpressionsmuster für gesunde Oropharynx-Schleimhaut. P16^{INK4a}, p53 und Cyclin D1 werden auf niedrigem Niveau exprimiert; eine Färbung wurde nur durch TSA-IHC Färbung sichtbar (Score 1); pRb ist dagegen stärker gefärbt (Score 2). Aufnahmen jeweils mit 10-fach Objektiv.

Die Scores gaben letztlich Aufschluss darüber, wie sich ein Tumor in der Expression eines bestimmten Proteins verhielt. Außerdem waren durch die Erstellung der Scores Assoziations- und Überlebensanalysen für die unterschiedlichen Expressionslevels der untersuchten Proteine eines Tumors schnell und unkompliziert möglich.

Tab. 3-2 Scoring-System auf Basis der Standard-IHC und TSA-IHC zur Ermittlung der Proteinexpressionslevel in den Tumoren.

Primär AK*/ Expressionslevel	Standard-IHC	TSA-IHC	Total	Bedeutung
p16^{INK4a}				
Expressionsverlust	0	0	0	aberrant
normal	0	1	1	gesund
hoch	1	1	2	aberrant
pRb				
niedrig	0; 1	-	0 oder 1	aberrant
normal	2	-	2	gesund
Cyclin D1				
Expressionsverlust	0	0	0	aberrant
normal	0	1	1	gesund
hoch	1	1	2	aberrant
p53				
Expressionsverlust	0	0	0	aberrant
normal	0	1	1	gesund
hoch	1	1	2	aberrant

*Antikörper; - nicht durchgeführt

3.9 Statistische Analysen

Die statistischen Analysen und Berechnungen dieser Arbeit wurden mit den Software-Programmen SPSS Statistics 19 (*statistical packages for social sciences*), SAS 9.2 (*statistical analysis software*), Sigma Plot 11 und Graph Pad Prism V5 durchgeführt. Ergebnisse wurden als statistisch signifikant bezeichnet, wenn ein p-Wert $\leq 0,05$ berechnet wurde.

Die Patienten- und Tumoreigenschaften wurden in Abhängigkeit ihres HPV16 DNA- und RNA-Status berechnet. Die Unterschiede zwischen den Gruppen wurden je nach Parameter entweder durch den Chi-Quadrat (χ^2)-Test, exakter Test nach Fisher oder den Wilcoxon-Rang-Test ermittelt.

3.9.1 Korrelationsanalysen

Eine Korrelation beschreibt den Zusammenhang zwischen zwei oder mehreren Variablen und wird als Korrelationskoeffizient ausgedrückt, ohne allerdings dabei auf Kausalität schließen zu lassen. Der Korrelationskoeffizient kann Werte zwischen +1 und -1 annehmen. Je näher der Koeffizient an Null ist, desto schwächer ist die Korrelation; ist er =0, so besteht keine Korrelation. Eine positive Korrelation besteht bei einem Korrelationskoeffizient >0 , <0 zeigt dagegen eine negative Korrelation an. Während für normalverteilte Variablen der *Pearson* Korrelationskoeffizient berechnet wurde, wurde für alle anderen Variablen mit anderen Skalierungen in dieser Arbeit der *Spearman* Rangkorrelationskoeffizient berechnet.

3.9.2 Clusteranalysen

Die Clusteranalyse der zellulären Proteine in Zusammenhang mit den HPV Gruppen wurde mit der frei-erhältlichen Software ‚MultiExperiment Viewer‘ (MeV; Version 4.7.3) berechnet und graphisch erstellt. In die Analyse wurden nur Tumoren eingeschlossen, die für alle eingeschlossenen Variablen auswertbar waren.

3.9.3 Überlebensanalysen

Um das Überleben der Patienten zu visualisieren wurden Kaplan-Meier Graphen erstellt. Unterschiede zwischen den Gruppen in den Graphen wurden durch den Log-Rank Test ermittelt. Anhand multivariater *Cox proportional hazard* Modelle wurden Assoziationen zwischen den viralen oder zellulären Markern oder Markerkombinationen und dem Gesamt- (OS) oder progressionsfreien Überleben (PFS) der Patienten unter Berücksichtigung klinischer und demografischer Einflussgrößen bestimmt.

Die mediane Nachbeobachtungszeit wurde nach Korn *et al.* (126) berechnet.

Patienten, für die zwar ihre individuelle Überlebenszeit vorlag, die exakte Überlebenszeit jedoch (noch) nicht bestimmt werden konnte, wurden als zensierte Fälle dokumentiert. Eine Zensierung tritt immer dann ein, wenn (i) ein Patient das Ereignis (z. B. Tod als Folge des OPSCC oder Folgeereignisse, z. B. Lokalrezidiv, Lymphknoten-, Fernmetastase oder Zweitkarzinom) vor dem Studienende nicht erreicht hat, (ii) eine Person vorzeitig aus der Studie ausscheidet (*lost to follow-up*) oder (iii) eine Person vor Studienende tumorunabhängig verstirbt. Dagegen wurden Patienten als *event* dokumentiert, die während der Studienperiode an ihrem Tumor verstorben waren (OS) oder ein Nachfolgeereignis (Lokalrezidiv, Lymphknoten-, Fernmetastase oder Zweitkarzinom in der Kopf-Hals Region; PFS) erlitten.

3.9.3.1 *Univariate Analysen des Gesamt- und Progressionsfreien Überlebens*

Mit Hilfe der univariaten Kaplan-Meier Analyse war es möglich die Wahrscheinlichkeit abzuschätzen, mit der das Ereignis (z. B. Tod oder Nachfolgeereignis) innerhalb eines Zeitintervalls nicht eintritt. Es wurde für die Patienten die Überlebenswahrscheinlichkeit bzw. die Wahrscheinlichkeit keine Nachfolgeereignisse zu erfahren in Abhängigkeit der Zeit nach Zeitpunkt der Diagnose des Primärtumors berechnet. Die Patienten wurden stratifiziert nach den viralen und zellulären Markern, um so das prognostische Potential des jeweiligen Markers zu bestimmen.

Die univariaten Kaplan-Meier Analysen sind jedoch rein deskriptive Analysen zur Darstellung des Überlebens, ohne aber mögliche Störfaktoren, sog. *confounder*, zu berücksichtigen. Daher sollten zusätzlich immer multivariate Analysen hinzugezogen werden, in denen die Überlebensmodelle auf die Störfaktoren angepasst werden können.

3.9.3.2 **Multivariate Analysen des Gesamt- und Progressionsfreien Überlebens**

Wie auch bei der Kaplan-Meier Analyse wird mit Hilfe des Cox Regressions Modells der Einfluss bestimmter Variablen, in der vorliegenden Arbeit waren dies die viralen und zellulären Marker, auf das Auftreten eines bestimmten Zielereignisses, z. B. tumorabhängiges Versterben oder Tumorfolgeereignisse, analysiert. Im Gegensatz zur rein deskriptiven Analyse (Kaplan-Meier) können aber bei der Cox Regression verschiedene Einflussfaktoren (auch Kovariaten genannt) berücksichtigt und nach diesen angepasst (adjustiert) werden. Zusätzlich muss die *„proportional hazard“*, die eine notwendige Voraussetzung für die Validität des Cox Regressions Modells ist, geprüft werden. So muss jede im Modell befindliche Variable über die Zeit proportional sein. Ist dies nicht der Fall, so muss mit anderen Methoden, z. B. der Stratifikation, für die entsprechende(n) Variable(n) adjustiert werden. Die Assoziation zwischen den Variablen und dem Überleben werden schließlich als *hazard ratio* (HR) ausgedrückt. Diese gelten als Maß für die Stärke der Assoziation zwischen Variable und Zielereignis.

In der vorliegenden Arbeit wurde das Überleben für die viralen und zellulären Marker zusammen mit den Kovariaten Alter (kontinuierliche Variable), Geschlecht (weiblich vs. männlich), klinisches Stadium (IV vs. I-III), Alkohol- und Tabakkonsum (ja oder ex vs. nie) und Primärtherapie (Radio- und/oder Chemotherapie vs. Operation) bestimmt. Bei den viralen Markern wurden die HPV-negativen OPSCC (HPV⁻ Gruppe), bei den zellulären Markern wurden die für HPV-negative Tumoren typischen Expressionslevel bzw. -muster als Referenzkategorie herangezogen. Die *„proportional hazard“* wurde nach Grambsch & Therneau (127) bzw. nach Schoenfeld (128) über die *‘Schoenfeld residuals’* geprüft und alle Kovariaten erfüllten diese Voraussetzung. Interaktionen zwischen den Variablen wurden getestet, aber nicht gefunden.

3.9.4 Assoziationsanalysen

Logistische Regressions Modelle, mit deren Hilfe *odds ratios* (OR) und die entsprechenden 95% Konfidenzintervalle (95%KI) berechnet werden, wurden angewandt, um Assoziationen zwischen den zellulären Markern oder Markerkombinationen und den HPV Gruppen (RNA⁻,

RNA⁺/CxCa⁺) zu bestimmen. Die OR gilt dabei als Maß für die Stärke der Assoziation zwischen Variable (zellulärer Marker) und Zielvariable (RNA⁻ oder RNA⁺/CxCa⁺ Gruppe).

Analog zu den Überlebensanalysen wurden auch diese Modelle auf die möglichen *confounder* Alter (kontinuierliche Variable), Geschlecht (weiblich vs. männlich), klinisches Stadium (IV vs. I-III) und Alkohol- und Tabakkonsum (ja oder ex vs. nie) angepasst. Die für HPV-negative Tumoren typischen Expressionslevel oder –muster wurden jeweils als Referenzkategorie herangezogen. Die Gruppe der HPV-negativen Tumoren plus der HPV DNA-positiven Tumoren ohne virale RNA-Muster (non-HPV) wurden als Kontrollen, die Gruppe der Tumoren mit viralen RNA-Mustern (RNA⁺/CxCa⁺) als Fälle definiert.

3.9.5 Berechnungen von Sensitivität, Spezifität, positiver und negativer prädiktiver Wert

Die Berechnung von Sensitivität, Spezifität, positiver und negativer Vorhersagewert für die zellulären Marker und Markerkombinationen war durch die Erstellung von Kreuztabellen möglich (Tabelle 3-3). Während die Sensitivität den Anteil der durch den Marker als korrekt-positiv klassifizierten Tumoren angibt ($P(\text{positiv erkannt} | \text{tatsächlich positiv}) = d/(b+d)$), gibt die Spezifität den Anteil der durch den Marker als korrekt-negativ klassifizierten Tumoren an ($P(\text{negativ erkannt} | \text{tatsächlich negativ}) = a/(a+c)$). Mit dem positiven Vorhersagewert wurde der Anteil der korrekt-positiven (d) unter der Gesamtheit (c+d) der durch den Marker erkannten positiven Tumoren berechnet ($P(\text{korrekt positiv} | \text{positiv erkannt}) = d/(c+d)$), mit dem negativen Vorhersagewert wurde der Anteil der als korrekt-negativen (a) unter der Gesamtheit (a+b) der durch den Marker negativ erkannten Tumoren ($P(\text{korrekt negativ} | \text{negativ erkannt}) = a/(a+b)$) bestimmt (Tabelle 3-3).

Tab. 3-3 Kreuztabelle für die Berechnung von Se, Sp, PPV und NPV.

Zellulärer Marker	HPV-negativ	RNA ⁺ /CxCa ⁺	total
Expressionslevel oder –muster typisch HPV ⁻	a	b	a+b
Expressionslevel oder –muster typisch RNA ⁺ /CxCa ⁺	c	d	c+d
total	a+c	b+d	a+b+c+d

4 ERGEBNISSE

4.1 Analysen an frisch-gefrorenem Tumormaterial: Virale Marker

Zunächst wurden die 199 Oropharynx Tumoren (OPSCC) auf die viralen Marker HPV DNA, Viruslast, onkogene RNA (E6*II und E6*I Transkript) und RNA-Muster untersucht. Für diese Analysen wurden frisch-gefrorene Tumorbiopsien verwendet. Der Begriff Marker oder auch Markerkombination wird in der vorliegenden Arbeit für alle Faktoren oder deren Kombinationen, die auf eine aktive HPV-Beteiligung hinweisen könnten, verwendet und schließt u.a. auch multiple Faktoren, wie z. B. die RNA-Muster als sog. Einzelmarker ein, die aus der Analyse mehrerer HPV Transkripte resultieren.

Anschließend wurde das Potential jedes Markers analysiert, einen HPV-assoziierten Oropharynx Tumor zu identifizieren. Als Maß für die Relevanz eines Markers wurde das Überleben der Patienten herangezogen.

4.1.1 HPV DNA-Analyse

Die DNA der Tumoren wurde mittels BSGP5+/6+-PCR/Multiplex HPV-Genotypisierung (MPG) und mittels quantitativer *real-time* HPV16 PCR (qPCR) auf die Anwesenheit von humaner Papillomvirus-DNA untersucht.

Während die MPG-Analyse erlaubte, in einem Ansatz die Prävalenz von 27 mukosalen HPV-Typen, darunter alle als Hochrisiko- oder mögliche Hochrisiko-Typen klassifiziert, gleichzeitig nachzuweisen und die Viruslast zu quantifizieren (123, 124, 129), sollten mittels qPCR die qualitativen sowie quantitativen Ergebnisse der MPG-Analyse für den wichtigsten HPV-Typ (HPV16) bestätigt werden. Da man *a priori* nicht davon ausgehen kann, dass HPV16 der einzige HPV-Typ ist, den man beim OPSCC finden kann, ist die PCR-basierte Methodik der *In-Situ* Hybridisierung eindeutig vorzuziehen. Die von uns gewählte Technologie ist außerdem wesentlich sensitiver und erlaubt eine quantitative Bestimmung der Viruslast.

Der Nachweis eines bestimmten HPV-Typs während der MPG erfolgte mit Hilfe des Luminex 100 Analyzers über die Messung der Fluoreszenzintensität, die durch die spezifische Hybridisierung eines PCR Produktes an die entsprechende Sonde erzeugt wurde. Die Messung einer Probe im Luminex war abgeschlossen, wenn mindestens 100 Beads jeder Beadsorte gezählt wurden. Ergebnisse wurden als Mediane Fluoreszenzintensität (median fluorescence intensity, MFI) aller gezählten Beads einer Sorte ausgedrückt. Zu jeder beadgekoppelten Sonde wurden anschließend Hintergrundsignale, dargestellt durch die

Fluoreszenzintensität ohne PCR-Produkte, von den MFI-Werten subtrahiert und die MFI-Netto-Werte zur Auswertung herangezogen.

Der Nachweis von HPV16 DNA während der qPCR erfolgte durch die Messung der Fluoreszenz des amplifizierten HPV DNA-Transkripts nach jedem PCR Zyklus. Die Methode ermöglichte durch die erhaltenen Standkurven die direkte und quantitative Angabe der HPV16 Genomkopien pro Zelle (copy/cell; Schmitt *et al.*, in Bearbeitung)

4.1.1.1 HPV DNA-Prävalenz

Von den 199 Tumoren waren 100 (50%) in der BSGP5+/6+-PCR/MPG positiv für HPV DNA, davon waren 97 Tumoren positiv für HPV16; die drei übrigen waren jeweils positiv für HPV18, 33 oder 35. Wegen der geringen Fallzahlen wurden diese drei Tumoren von den weiteren Analysen ausgeschlossen. Multiple Infektionen oder Infektionen mit ‚low-risk‘ HPV-Typen wurden nicht gefunden.

Es wurde ein signifikanter Anstieg der HPV16 DNA-Prävalenz über die Jahre 1990 bis 2008 beobachtet: Unter den ersten 98 Tumoren, die von 1990 bis Juni 1999 gesammelt wurden, waren 36 (37%) HPV16 DNA-positiv, während unter den letzten 98 Tumoren, die von Juli 1999 bis Juli 2008 gesammelt wurden, 61 (63%) HPV16 DNA-positive OPSCC zu verzeichnen waren (Tabelle 4-1). Der kontinuierliche Anstieg über die Zeit war auch in kleineren Zeitsegmenten sichtbar (Abbildung 4-1). Hierfür wurde die gesamte Tumorkohorte (n=196) als Quartile über den Studienzeitraum aufgeteilt; jedes Quartil enthielt dementsprechend 49 Tumoren. Die relative HPV16 DNA-Prävalenz stieg kontinuierlich von 35% in der ersten über 39% in der zweiten und 57% in der dritten, auf schließlich 67% in der letzten Studienperiode an (Abbildung 4-1).

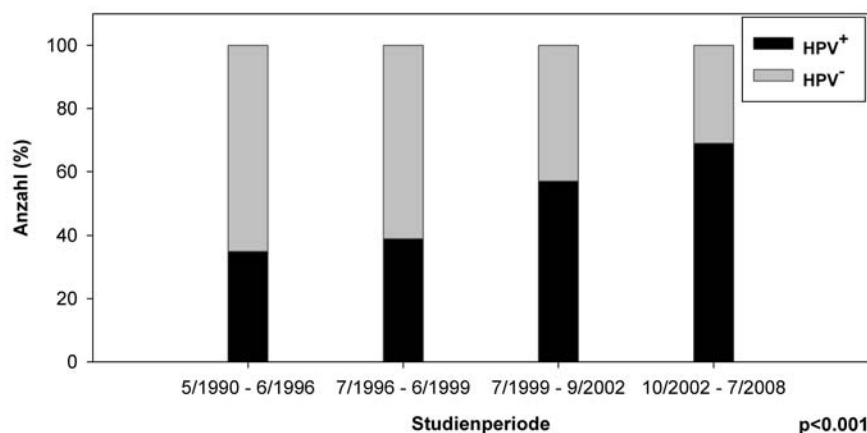


Abb. 4-1 HPV16 DNA-Prävalenz über den gesamten Studienzeitraum.

Die Studienperioden wurden durch jeweils n=49 Tumoren dargestellt.

Schwarz, HPV⁺ OPSCC (%); grau, HPV⁻ OPSCC (%); der p-Wert wurde durch den Chi-Quadrat-Test bestimmt.

Von 97 HPV16 DNA-positiven Tumoren ermittelt durch BSGP5+/6+-PCR/MPG wurden gleichzeitig 86 Tumoren positiv durch die qPCR getestet. Demnach wurde eine Übereinstimmung beider Methoden von 89% (*Spearman's rank* Korrelationskoeffizient $r=0.93$, $p<0,01$) erreicht. Jedoch wurden 11 Tumoren mittels qPCR HPV16 DNA-negativ getestet. Diese zeigten auch in der MPG sehr niedrige HPV16 MFI-Werte. Die MPG Analyse scheint daher die sensitivere Methode zu sein, sie hat eine analytische Sensitivität von 1 bis 10 Genomkopien pro PCR für die Detektion von HPV16 (124), während die Sensitivität der qPCR bei 10 Genomkopien pro Zelle liegt. Die Signale der 11 Tumoren lagen demnach unterhalb der Detektionsgrenze der pPCR.

Die Stratifizierung nach HPV16 DNA für die folgenden Analysen erfolgte anhand der qualitativen BSGP5+/6+-PCR/MPG-Ergebnisse, sodass 99 HPV-negative (HPV⁻ Gruppe) und 97 HPV16-positive (HPV⁺ Gruppe) OPSCC Patienten für die weiteren Analysen eingeschlossen wurden (Abbildung 4-9).

4.1.1.2 Co-Amplifizierung von HPV16 und Beta-Globin

Sowohl in die BSGP5+/6+-PCR als auch in die qPCR waren Primer für die Amplifikation des zellulären Beta-Globin Gens integriert. Dies diente als DNA-Qualitätskontrolle, um falsch-negative HPV-Ergebnisse auszuschließen. Zusätzlich dienten die Beta-Globin Signale bei der BSGP5+/6+-PCR/MPG (MFI-Signale) zur Quantifizierung der HPV-Signale. Die Beta-Globin PCR-Produkte hybridisierten während der MPG spezifisch an beadgekoppelte Beta-Globin Sonden und wurden anschließend durch den Luminex Analyser detektiert.

Die Qualität der 199 DNA Proben dieser Studie war ausreichend gut, da das Beta-Globin Gen in jeder Tumor-DNA co-amplifiziert werden konnte. Bei degradierter DNA bzw. einer DNA-Konzentration von weniger als 1 ng in der Probe (124, 130) wäre die Amplifikation und infolgedessen eine Detektion der Beta-Globin Signale nicht möglich. Ein Ausschluss von Tumoren aus der Studie war demnach nicht erforderlich.

Erwartungsgemäß stand die gleichzeitige Amplifikation des Beta-Globin Gens und des HPV16-Gens während der MPG in einer inversen Beziehung zueinander, d. h. je mehr HPV-Genomkopien in der Probe vorhanden waren, desto geringer waren die Beta-Globin MFI-Signale; bei Proben mit geringen HPV16 MFI-Werten (wenige HPV-Genomkopien) oder bei HPV-negativen Proben fielen die Beta-Globin MFI-Signale dementsprechend höher aus. Die inverse Beziehung zwischen den Beta-Globin Signalen und den HPV16 Signalen ist in Abbildung 4-2 dargestellt und statistisch signifikant ($r= -0,73$; $p<0,001$; Pearson's Korrelation).

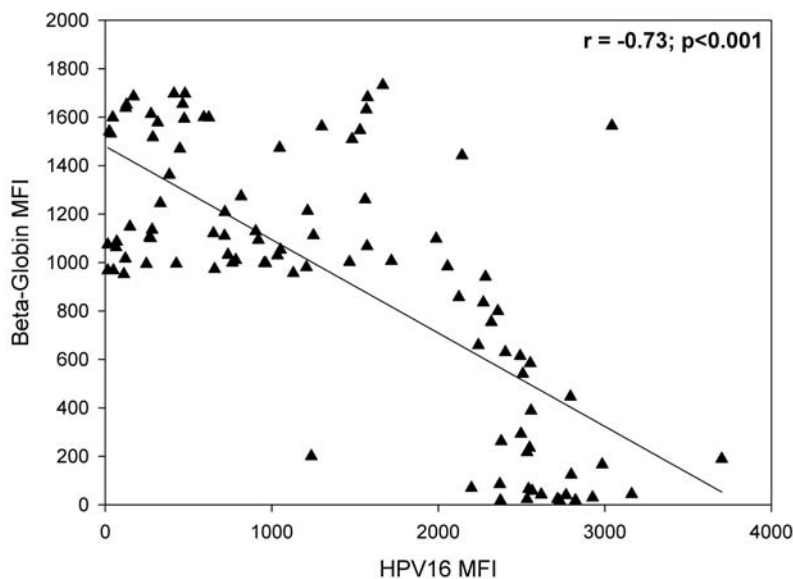


Abb. 4-2 Korrelation der HPV16 und Beta-Globin Signale in der BSGP5+/6+-PCR/MPG. HPV16 MFI-Werte sind auf der x-Achse, Beta-Globin MFI-Werte sind auf der y-Achse dargestellt; jedes Dreieck repräsentiert eine Tumor-DNA. Der Korrelationskoeffizient beträgt $r = -0,73$ und wurde durch Pearson Korrelation bestimmt.

4.1.1.3 HPV Viruslast

Die Viruslast der Tumoren wurde quantitativ sowohl für die BSGP5+/6+-PCR/MPG-Ergebnisse als auch für die qPCR-Ergebnisse bestimmt.

Eine Quantifizierung der HPV16 MPG-Signale wurde zunächst für jede positive Reaktion durch die Berechnung der relativen HPV16 MFI-Signale in Prozent erreicht. Hierfür wurden die gemessenen HPV16 MFI-Signale jeweils durch das maximal gemessene HPV16 MFI-Signal (max. Signal=3702 MFI) dividiert (%HPV MFI-Wert). Anschließend wurden die relativen MFI-Werte durch die gleichzeitig gemessenen Beta-Globin MFI-Signale der jeweiligen Probe dividiert; dadurch wurde ein nicht-deskriptiver Wert der Viruslast erhalten (%HPV MFI-Wert/Beta-Globin MFI Signal). Eine hohe Viruslast war durch einen vordefinierten Cut-off (7×10^{-4} units) für Hr-HPV Typen festgelegt. Dieser Cut-off war so optimiert worden, um zwischen Abstrichen des Gebärmutterhalses mit normaler und abnormaler Zytologie unterscheiden zu können (Schmitt *et al.*, in Bearbeitung). Basierend auf diesem Cut-off hatten von 97 HPV⁺ Tumoren 66 (68%) eine niedrige und 31 (32%) eine hohe Viruslast.

Durch die qPCR war eine genauere Definition der Viruslast möglich, weil hier im Gegensatz zur MPG, die exakte HPV-Genomkopienzahl pro Zelle bestimmt werden konnte. Da eine HPV-Genomkopie pro Zelle als biologisch relevant und ausreichend für eine kausale Beteiligung am Tumorgeschehen anzusehen ist, und da der durchschnittliche Tumoranteil im

Gewebe in dieser Studie 50% betrug, wurde der Cut-off für eine hohe Viruslast auf 0,5 HPV-Kopien pro Zelle festgelegt. Nach der qPCR wurden von 97 HPV⁺ OPSCC 64 (66%) als Tumoren mit niedriger und 33 (34%) als Tumoren mit hoher Viruslast eingestuft (Abbildung 4-9).

Die Ergebnisse beider Methoden, BSGP5+/6+-PCR/MPG und qPCR, korrelierten signifikant ($r=0,95$; $p<0,01$; *Spearman's rank* Korrelation). Lediglich zwei Tumoren, die nach BSGP5+/6+-PCR/MPG mit niedriger Viruslast eingestuft wurden, hatten nach pPCR eine hohe Viruslast. Beide Tumoren lagen in der Nähe des MPG und auch des qPCR Cut-offs (Abbildung 4-3).

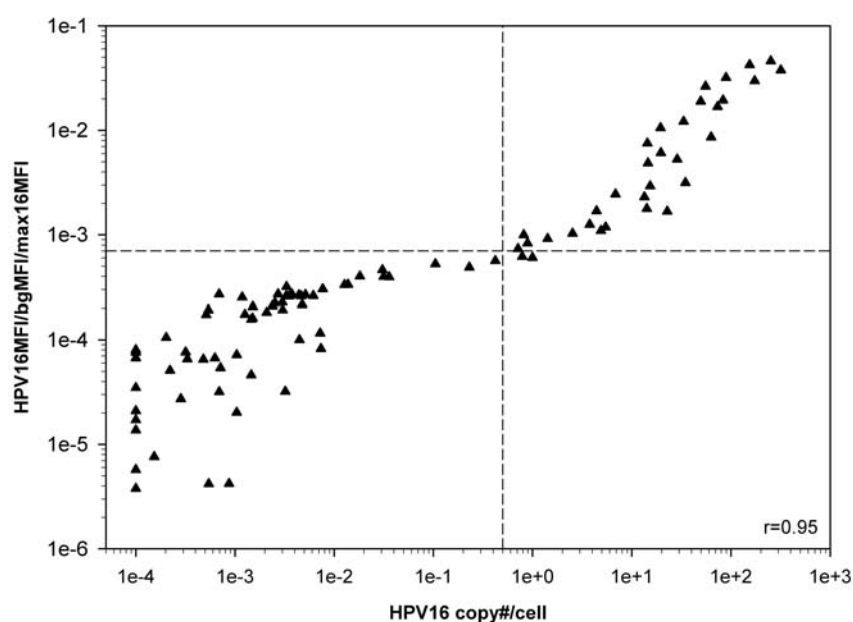


Abb. 4-3 Korrelation der HPV DNA Analysen durch MPG und qPCR.

Die Werte der MPG sind auf der y-Achse (HPV16MFI/bgMFI/max16 MFI), die Werte der qPCR auf der x-Achse als HPV16 Genomkopienzahl pro Zelle (HPV16 copy#/cell) und die Cut-offs als gestrichelte Linien dargestellt. Der Korrelationskoeffizient beträgt $r=0,95$ (*Spearman's rank* Korrelation; $p<0,01$).

Die Stratifizierung nach HPV-Viruslast für die folgenden Analysen erfolgte auf Basis der qPCR. Dementsprechend wurde die Tumorgruppe mit niedriger Viruslast (HPV_{low}) durch 64 und die Tumorgruppe mit hoher Viruslast (HPV_{high}) durch 33 Tumoren repräsentiert (Abbildung 4-9).

4.1.2 HPV16 mRNA Analyse

Um eine aktive Beteiligung des Virus am Tumorgeschehen zu untersuchen, wurden die 97 HPV⁺ Tumoren auf die Expression von (i) onkogenen E6*I und E6*II Transkripten und (ii) viralen RNA-Mustern, die spezifisch für Karzinome und hochgradige Läsionen der Zervix sind (39), analysiert.

4.1.2.1 Quantitative HPV16 E6*I und E6*II RNA Analysen

Die Präsenz von HPV16 DNA im Tumor weist zwar auf eine Infektion des Gewebes mit dem Virus hin, jedoch kann über die biologische Aktivität des Virus keine Aussage getroffen werden. Als wichtiger Indikator für eine aktive Beteiligung des Virus am Tumorgeschehen gilt die Expression der Onkogene E6 und/oder E7. Da es bislang keine für immunhistochemische Analysen geeigneten und kommerziell erwerblichen Antikörper gegen das E6- und/oder E7-Protein gibt, wurden in dieser Arbeit die 97 HPV⁺ Tumoren zunächst auf die viralen E6*II und E6*I mRNA Transkripte untersucht (siehe 3.5.2, Methodenteil). Wird eine Virus-mRNA von der Wirtszelle transkribiert, so ist die anschließende Expression des Virusproteins sehr wahrscheinlich und das Virus gilt somit als biologisch aktiv. Bei beiden Transkripten handelt es sich um häufige Splicevarianten von HPV16, die potentiell für das frühe Virusprotein E7 kodieren (39). Die E6*I mRNA ist gegenüber der E6*II mRNA in Tumorzellen die häufigere Splicevariante; sie wird ca. 10-mal häufiger transkribiert (40).

Durch die Zugabe von *in vitro* transkribierter E6*II-Kalibrator RNA (Q-RNA) einer bestimmten Konzentration zum NASBA-Reaktionsmix wurde die Quantifizierung der E6*II und E6*I Transkripte der Tumorproben ermöglicht. Wildtyp-RNA (wt-RNA) und Q-RNA wurden während der NASBA zunächst als cDNA synthetisiert. Da beide cDNA-Typen mit den gleichen Primerpaaren amplifiziert wurden, handelte es sich hierbei um eine kompetitive Amplifikation der beiden RNA Typen (siehe 3.5.2.1, Methodenteil). Das Verhältnis (Ratio E6*II oder E6*I vs. Q-E6*II) beider Amplimere am Ende der Reaktion spiegelte somit das tatsächliche Verhältnis der beiden Transkripte, wt-E6*II und Q-E6*II, zu Beginn der Amplifikation wider. Schließlich wurde die in der Tumorprobe befindliche wt-RNA anhand einer externen Standardkurve quantifiziert. Die Standardkurve wurde durch eine 10-fach Verdünnungsreihe von *in vitro* transkribierter wt-RNA unter Anwesenheit einer konstanten Q-RNA Konzentration generiert. Sie stellt das Verhältnis zwischen *in vitro* transkribierter wt-RNA (E6*II) und Q-RNA dar (Abbildung 4-4). Die kompetitive Amplifikation beider Transkripte ist deutlich zuerkennen; je höher die Konzentration eingesetzter wt-RNA, d. h. je höher die MFI-Werte der wt-RNA, desto niedriger die entsprechenden Q-RNA MFI-Werte im gleichen Ansatz. Diese inverse Beziehung wurde wie erwartet auch zwischen der wt-RNA klinischer

Proben und der Q-RNA bei gleichzeitiger Amplifikation beobachtet ($r = -0,76$; $p < 0,01$; *Pearson* Korrelation, Abbildung 4-5). Die wt-RNA MFI-Werte der klinischen Proben wurden entsprechend durch die Q-RNA MFI-Werte dividiert und anhand der externen Standardkurve quantifiziert.

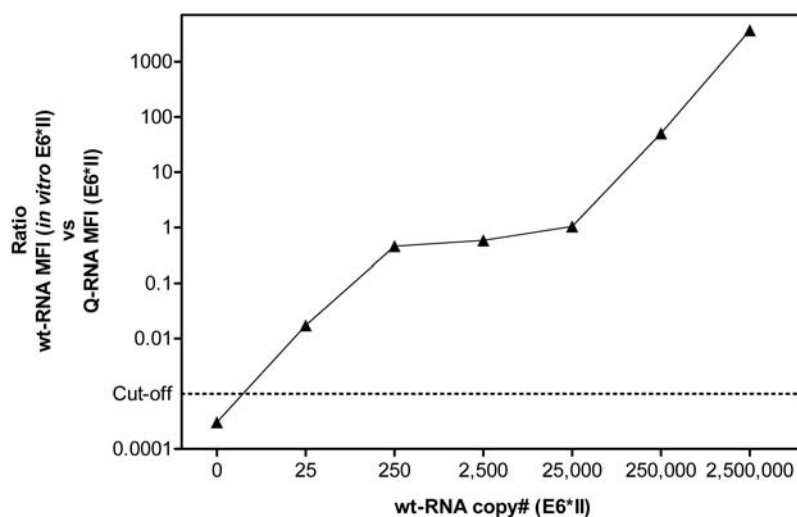


Abb. 4-4 Externe Standardkurve von *in vitro* transkribierter wt-RNA (E6*II) und Q-RNA zur Quantifizierung der klinischen Tumorproben.

Jedes Dreieck stellt den Quotienten für die wt-RNA vs Q-RNA (y-Achse) und die entsprechende Kopienanzahl für das E6*II Transkript (x-Achse) dar. Quotienten unterhalb des Cut-offs wurden als E6*II-negativ gewertet.

Da für diejenigen Proben, die nur für das E6*I Transkript positiv waren, keine entsprechende Q-RNA zur Verfügung stand, wurden diese ebenfalls mit Hilfe der E6*II Q-RNA und der E6*II-Standardkurve quantifiziert.

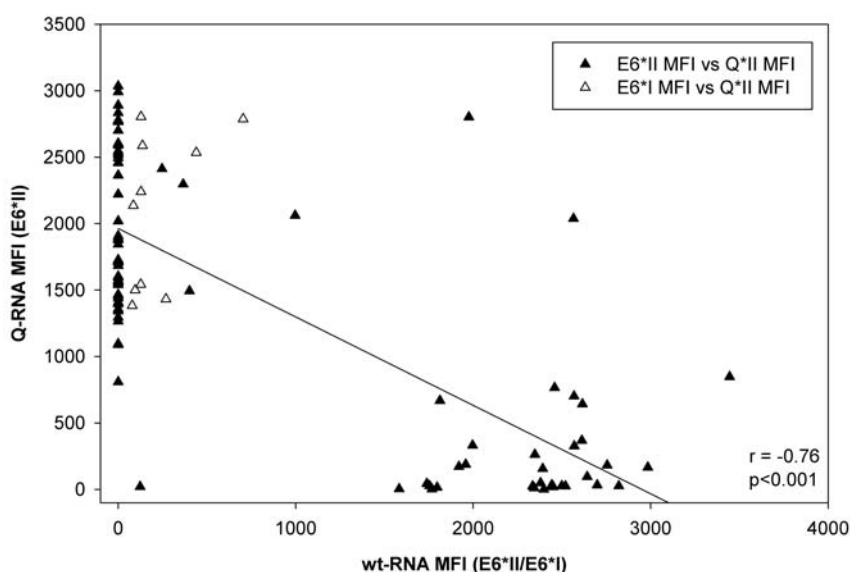


Abb. 4-5 Korrelation der HPV16 E6*II/E6*I MFI Signale und der E6*II-Kalibrator (Q-RNA) MFI-Signale. Schwarze Dreiecke, OPSCC mit E6*II MFI-Werten; weiße Dreiecke, OPSCC mit E6*I MFI-Werten; der Korrelationskoeffizient beträgt $r = -0,76$ (*Pearson* Korrelation, $p < 0,001$).

Von 96 HPV⁺ Tumoren, ein HPV_{low} Tumor musste aufgrund unzureichenden Biopsiematerials von den RNA-Analysen ausgeschlossen werden, exprimierten 48 (50%) das E6*I Transkript, von denen 38 zusätzlich das E6*II Transkript exprimierten. Die Gruppierung nach HPV16 E6*II und E6*I RNA-Status ergab dementsprechend 48 RNA-positive Tumoren (RNA⁺ Gruppe) und 48 RNA-negative Tumoren (RNA⁻ Gruppe, Abbildung 4-9).

Von den 33 Tumoren mit einer hohen Viruslast exprimierten 32 (97%) Tumoren die viralen E6*-Transkripte, mit einer Ausnahme waren alle positiv für E6*II und E6*I. Diese Tumoren hatten zudem eine hohe Kopienanzahl an RNA-Transkripten (Abbildung 4-6). Dagegen waren unter den 64 Tumoren mit einer niedrigen Viruslast 16 (25%) RNA⁺ Tumoren zu verzeichnen, von denen nur sieben Tumoren positiv für beide Transkripte waren. Außerdem waren diese Tumoren eher durch eine niedrige RNA-Kopienanzahl charakterisiert (Abbildung 4-6).

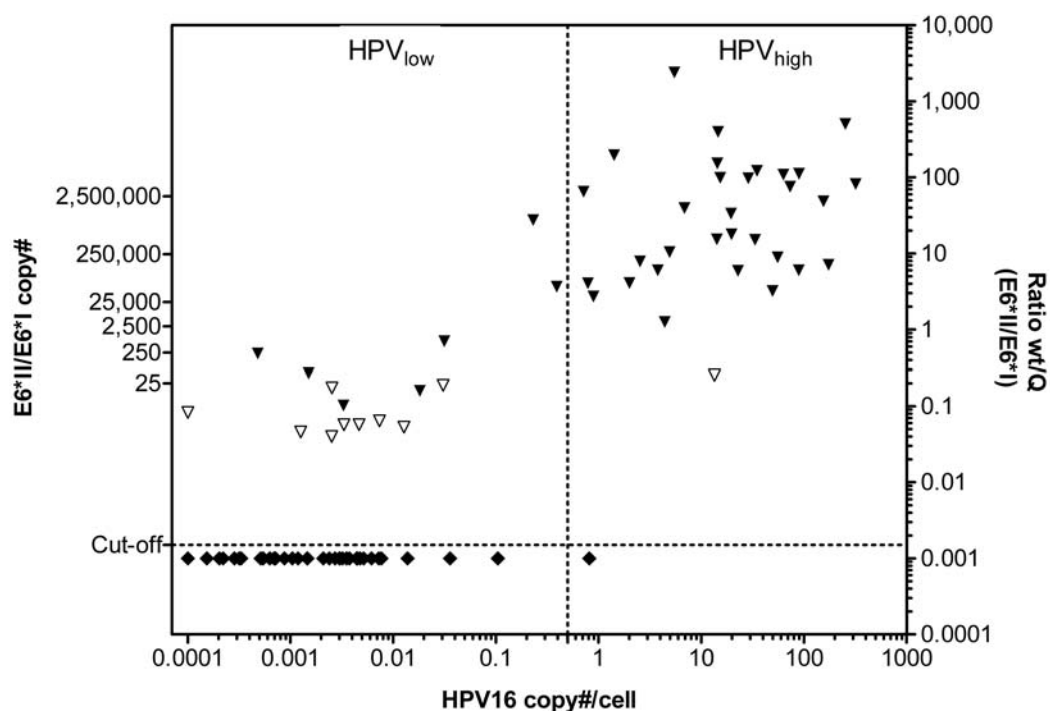


Abb. 4-6 HPV16 Viruslast in Abhängigkeit der E6*II/E6*I Kopienzahl.

Schwarze Dreiecke, OPSCC mit Kopienzahlen für das E6*II Transkript; weiße Dreiecke, Kopienzahlen für das E6*I Transkript in OPSCC ohne E6*II Transkript; gestrichelte Linien repräsentieren die jeweiligen Cut-offs. Das wt/Q-Verhältnis für E6*II/E6*I-negative Tumoren (MFI=0; Rauten) konnte aufgrund der logarithmischen Skalierung im Graph nicht dargestellt werden; ihnen wurde daher der Wert wt/Q=0,001 zugewiesen. HPV_{low} und HPV_{high}, Tumoren mit niedriger bzw. hoher Viruslast.

4.1.2.2 HPV16 RNA-Muster

Kürzlich wurden spezifische HPV16 RNA-Muster (RNA Muster-1 und 2, siehe 3.5.2.5, Methodenteil) beschrieben, anhand derer Zervixabstriche mit normaler Zytologie oder mit niedriggradigen Läsionen von solchen mit hochgradigen Läsionen oder mit Zervixkarzinomen (CxCa) unterschieden werden können (39). Diese viralen RNA-Muster beruhen auf der Expression vier verschiedener Transkripte, E6*II (226[^]526), E1[^]E4 (880[^]3358), E1C (880[^]2582) und L1 (3632[^]5639), und deren quantitativen Verhältnissen zu einander. In der vorliegenden Studie war es von Interesse, ob diese spezifischen viralen RNA-Muster ebenso in den Tumoren des Oropharynx exprimiert werden. In diesem Fall würden sie einen besseren Marker für eine aktive Beteiligung von HPV16 darstellen als das E6*II oder E6*I Transkript allein. Insbesondere sollten die viralen RNA-Muster ermöglichen, zwischen Tumoren mit integrierten und episomalen HPV16 Genomen zu differenzieren.

Um die spezifischen RNA-Muster in den OPSCC dieser Studie zu analysieren, wurden die 48 RNA⁺ Tumoren auf die Expression der Transkripte E1[^]E4, E1C und L1 untersucht. Für die RNA-Qualitätskontrolle wurden alle 48 RNA⁻ Tumoren zusätzlich auf die Expression des zellulären Ubiquitin C (Ubc) Transkripts untersucht, um falsch-negative E6*II oder E6*I-Ergebnisse auszuschließen. Bei degradiertem RNA oder einer zu geringen RNA-Konzentration wäre die Amplifikation und entsprechend eine Detektion der Ubc-Signale nicht möglich. Da das Ubc Transkript für jede der 48 RNA⁻ Proben amplifiziert wurde, war ein Ausschluss von Tumoren aus der Studie nicht erforderlich.

Die Quantifizierung der jeweiligen Transkripte erfolgte analog zu den E6*II oder E6*I Transkripten mit den entsprechenden Q-RNAs und externen Standardkurven (siehe 3.5.2.4, Methodenteil und 4.1.2.1, Ergebnisteil). Eine signifikant inverse Beziehung zwischen wt-RNA und Q-RNA wurde für die Transkripte E1[^]E4 (Abbildung 4-7A; $r = -0,83$; $p < 0,001$; *Pearson* Korrelation) und L1 (Abbildung 4-7B; $r = -0,56$; $p < 0,001$; *Pearson* Korrelation) beobachtet; für die Transkripte E1C ($r = -0,17$; $p = 0,2$; *Pearson* Korrelation) und Ubc ($r = -0,11$; $p = 0,4$; *Pearson* Korrelation) wurde eine nur schwache inverse Korrelation festgestellt. Dieser Befund ist auch für klinische Proben der Zervix bekannt (39). Es werden bei den klinischen Proben für E1C häufig nur sehr geringe MFI-Werte gemessen, die weniger als 5000 Kopien pro Reaktion repräsentieren. In diesem Bereich kommt es allerdings noch nicht zu einer kompetitiven Amplifikation der entsprechenden Q-RNA. Die Quantifizierung der E1C Transkripte war trotzdem möglich; die Quantifizierung für das Ubc Transkript war nicht erforderlich, da es allein der Qualitätskontrolle diene.

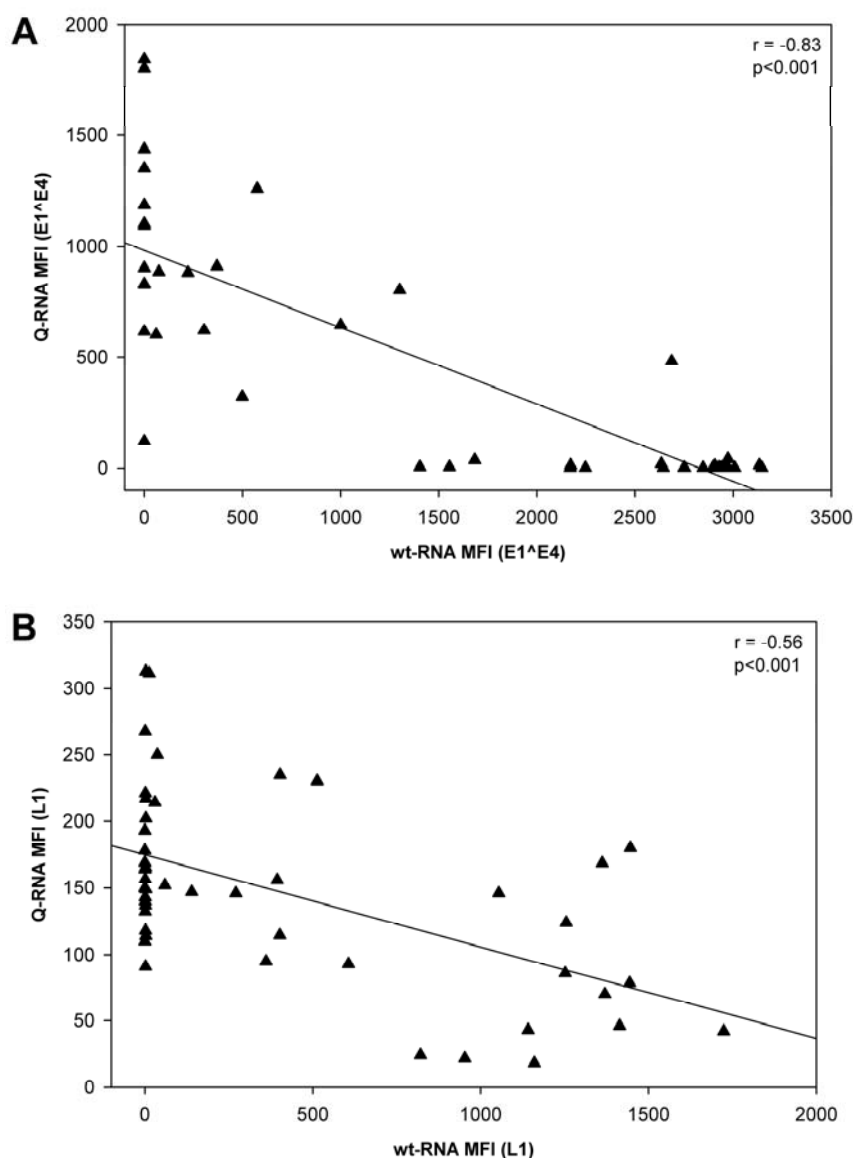


Abb. 4-7 Korrelationen zwischen den MFI-Signalen der wt-Transkripte E1^E4 (A) und L1 (B) und den entsprechenden Kalibrator (Q) MFI-Signalen. Dreiecke repräsentieren das wt-RNA Signal (x-Achse) der klinischen Proben und das gleichzeitig gemessene Q-RNA Signal (y-Achse); die Korrelationskoeffizienten wurden mittels Pearson Korrelation bestimmt.

Um schließlich die RNA Muster-1 und 2 zu erhalten, wurden die Transkript-Verhältnisse (wt-RNA vs. Q-RNA) durcheinander dividiert: E6*-Verhältnis vs. E1^E4-Verhältnis (Muster-1), sowie E1C-Verhältnis vs. L1-Verhältnis (Muster-2). Von den 48 RNA⁺ Tumoren dieser Studie, waren demzufolge 40 (83%) OPSCC positiv für die viralen RNA-Muster. Von diesen 40 Tumoren exprimierten 12 (25%) das Muster-1 (E6*/E1^E4 Verhältnis > 1,5), 25 exprimierten das Muster-2 (E1C/L1 Verhältnis > 0,003) und drei Tumoren waren positiv für beide RNA-Muster (Abbildung 4-8). Die acht RNA⁺ Tumoren, die keine spezifischen RNA-Muster zeigten, wiesen sehr niedrige Signale für alle viralen Transkripte auf (Tabelle 9-1, Anhang).

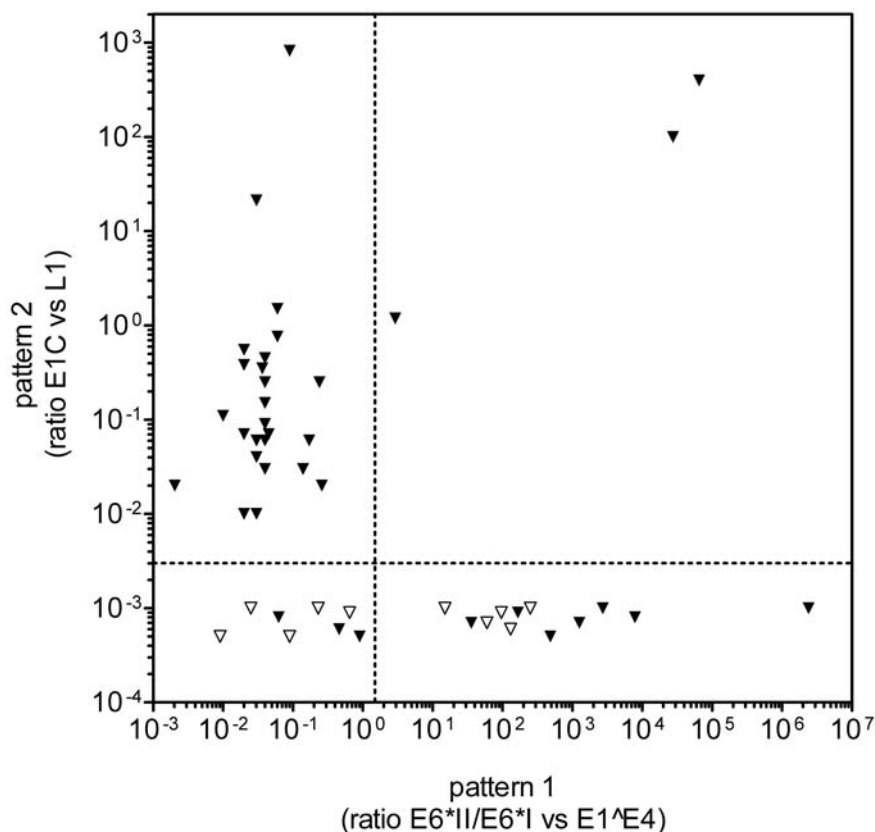


Abb. 4-8 Virale RNA-Muster analog zum Zervixkarzinom in HPV16 E6*II/E6*I positiven OPSCC (n=48). Tumoren mit Muster-1 (*pattern 1*) befinden sich im Quadranten rechts unten (n=12), Tumoren mit Muster-2 (*pattern 2*) links oben (n=25), Tumoren mit beiden RNA-Mustern rechts oben (n=3) und Tumoren ohne RNA-Muster befinden sich im Quadranten links unten (n=8). Schwarze Dreiecke, OPSCC positiv für E6*II/E6*I; weiße Dreiecke, OPSCC positiv nur für E6*I. Gestrichelte Linien repräsentieren die Cut-offs für die Transkript-Ratios (Cut-off Muster-1 > 1,5; Cut-off Muster-2 > 0,003).

Insgesamt lagen die Transkript-Verhältnisse (E6* vs. E1^{E4}) für 15 von 40 (37%) OPSCC oberhalb des Cut-offs für Muster-1, d. h. bei diesen 15 Tumoren lag das HPV16 Genom höchstwahrscheinlich integriert vor, während bei 25 (63%) OPSCC das Virusgenom nicht integriert, sondern vermutlich als episomales Plasmid vorlag, da diese Tumoren das Muster-2 exprimierten (E1C vs. L1).

Die Stratifizierung der HPV16 DNA-positiven Tumoren nach viralen RNA-Mustern für die folgenden Analysen ergab damit 40 Tumoren mit viralen RNA-Mustern (RNA⁺/CxCa⁺ Gruppe) und 56 Tumoren, die sich aus 48 RNA⁻ Tumoren plus 8 RNA⁺ Tumoren ohne virale RNA-Muster (RNA⁺/CxCa⁻ Gruppe) zusammensetzten (Abbildung 4-9).

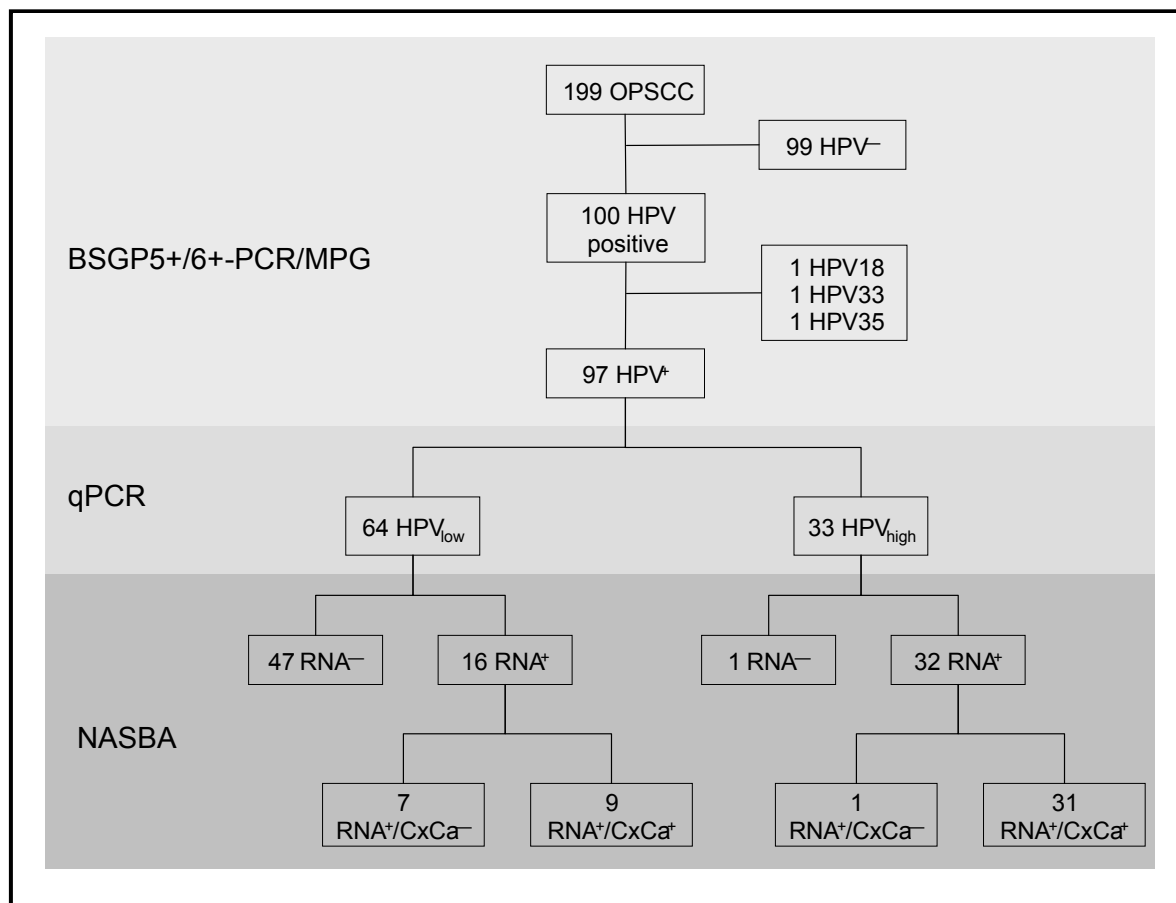


Abb. 4-9 Übersicht der OPSCC-Gruppierungen in Abhängigkeit von DNA-Status, Viruslast und RNA-Status.

HPV⁻, HPV DNA-negative OPSCC; HPV⁺, HPV16 DNA-positive OPSCC, analysiert durch MPG (BSGP5+/6+-PCR/MPG); HPV_{low}/HPV_{high}, OPSCC mit niedriger/hoher Viruslast, bestimmt nach quantitativer *real-time* PCR (qPCR); RNA⁻, HPV16 DNA-positive, aber E6*II/E6*I RNA-negative OPSCC; RNA⁺, HPV16 DNA- und E6*II/E6*I RNA-positive OPSCC; RNA⁺/CxCa⁻, HPV16 DNA- und E6*II/E6*I RNA-positive OPSCC, jedoch ohne RNA-Muster; RNA⁺/CxCa⁺, HPV16 DNA- und E6*II/E6*I RNA-positive OPSCC mit RNA-Mustern. NASBA, *nucleic acid sequence based amplification*. In der Abb. nicht gezeigt: 1/64 HPV_{low} OPSCC wurde aufgrund ungenügenden Biopsiematerials von den RNA-Analysen ausgeschlossen.

4.1.2.3 HPV16 RNA-Prävalenz

Analog zum Anstieg der HPV16 DNA-Prävalenz während des Beobachtungszeitraums (siehe 4.1.1.1, Ergebnisteil), stieg ebenso die Prävalenz der Tumoren mit viralen RNA-Mustern in der gesamten Tumorkohorte signifikant an: In der ersten Studienperiode (5/1990 bis 6/1996) waren 9/49 (19%) RNA⁺/CxCa⁺ Tumoren und in der letzten Studienperiode (10/2002 – 7/2008) waren doppelt so viele (19/49; 39%) RNA⁺/CxCa⁺ Tumoren zu verzeichnen (Abbildung 4-10). Unter den HPV⁺ Tumoren war dagegen kein signifikanter Anstieg der RNA⁺/CxCa⁺ Tumoren zu erkennen: Während in der ersten Studienperiode 9/17 (53%) der HPV⁺ OPSCC die viralen RNA-Muster exprimierten, waren es in den folgenden

zwei Perioden nur noch 6/19 (32%) bzw. 6/28 (21%) und in der letzten Periode wieder 19/33 (58%, Abbildung 4-10).

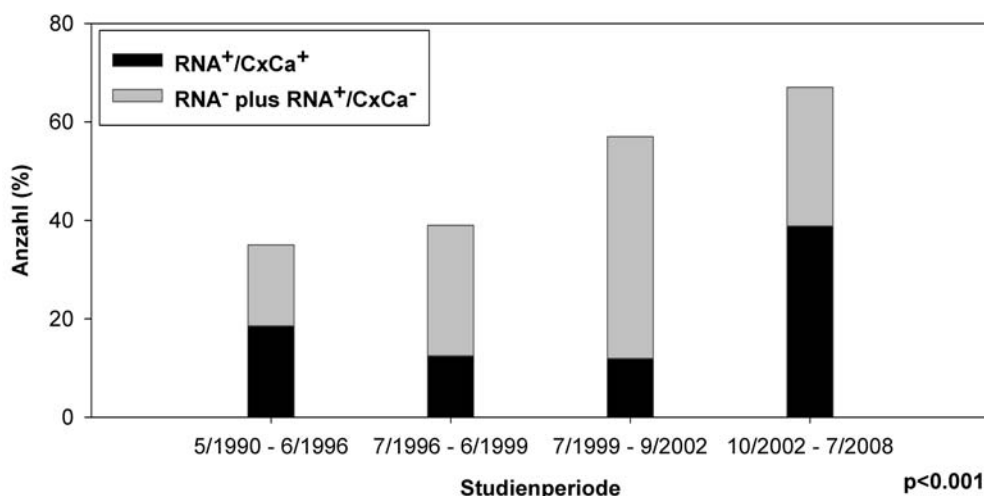


Abb. 4-10 Prävalenz der HPV16 RNA-Muster in HPV16 DNA-positiven OPSCC.

Die Balken repräsentieren die HPV⁺ Prävalenz (%) in den verschiedenen Studienperioden; eine Studienperiode umfasste jeweils n=49 Tumoren. Schwarz, Anteil der HPV⁺ OPSCC mit viralen RNA-Mustern (%); grau, Anteil der HPV⁺ OPSCC ohne virale RNA-Muster (RNA⁻ plus RNA⁺/CxCa⁻). Der p-Wert wurde durch den Chi-Quadrat-Test ermittelt und bezog sich auf den Anstieg der RNA⁺/CxCa⁺ innerhalb der gesamten Studienkohorte über den Zeitraum von 1990 bis 2008.

4.1.3 Patienten- und Tumorcharakteristika in Abhängigkeit des HPV16 DNA- und RNA-Status

Demographische und klinische Daten, z. B. die Risikofaktoren Alkohol- und Tabakkonsum, wurden aus den Anamnesebögen der elektronischen Patientenakten des Universitätsklinikums in Heidelberg erfasst. Im Folgenden wurden die Patienten- und Tumorcharakteristika unter Berücksichtigung des HPV16 DNA- und RNA-Status des Tumors analysiert (Tabelle 4-1).

Für Geschlecht, Alter und Tabakkonsum der Patienten, sowie Tumorgroße, Lymphknoten- und Fernmetastasenstatus und klinisches Stadium wurden keine Unterschiede zwischen HPV⁻ und HPV⁺ Tumoren festgestellt. Ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen HPV⁻ und HPV⁺ war dagegen für die Tumorklassifikation innerhalb des Oropharynx und für den Alkoholkonsum der Patienten zu verzeichnen: Während HPV⁺ Tumoren hauptsächlich in den Tonsillen lokalisiert waren, waren unter den Patienten der HPV⁻ Gruppe vermehrt ehemalige Alkoholiker (Tabelle 4-1).

Patienten mit viralen RNA-Mustern in den Tumoren unterschieden sich dagegen signifikant von HPV⁺ Patienten ohne diese RNA-Muster hinsichtlich ihres Alters, ihres Tabakkonsums

und der Primärtherapie. Patienten der RNA⁺/CxCa⁺ Gruppe waren älter, häufiger Nichtraucher und sie wurden meist primär operiert im Vergleich zu Patienten der RNA⁻ Gruppe. Außerdem waren RNA⁺/CxCa⁺ Tumoren von geringerer Größe (T1-T2), hatten weniger Fernmetastasen, aber einen höheren Lymphknotenstatus (N>0) und demzufolge ein fortgeschrittenes klinisches Stadium (Stadium IV; Tabelle 4-1).

Tab. 4-1 Patienten- und Tumorcharakteristika in Bezug auf den HPV16 Status.

	HPV ⁻⁴			HPV ⁺⁵		p	RNA ⁻⁶		RNA ⁺ CxCa ⁺⁷		p
	Total	(n=99)		(n=97)			(n=56)		(n=40)		
Charakteristika	n	n	(%)	n	(%)		n	(%)	n	(%)	
Geschlecht											
<i>männlich</i>	146	79	(80)	67	(69)	0,08 [†]	41	(73)	25	(63)	0,3 [†]
<i>weiblich</i>	50	20	(20)	30	(31)		15	(27)	15	(37)	
Alter (Jahre)											
<i>median</i>	57	56,7		57,4		0,4 [#]	56,1		62,1		0,01 [#]
Oropharynx Region											
<i>Tonsille</i>	84	33	(33)	51	(53)	0,02 [†]	30	(54)	20	(50)	0,1 [†]
<i>Zungengrund</i>	45	27	(27)	18	(18)		7	(12)	11	(27)	
<i>andere</i>	67	39	(40)	28	(29)		19	(34)	9	(23)	
Tumorgröße											
<i>T1-T2</i>	87	44	(45)	43	(45)	0,9 [†]	20	(36)	23	(59)	0,03 [†]
<i>T3-T4</i>	107	54	(55)	53	(55)		36	(64)	16	(41)	
<i>na¹</i>	2	1		1					1		
Lymphknoten											
<i>N0</i>	47	24	(24)	23	(24)	0,9 [†]	18	(32)	5	(13)	0,03 [†]
<i>N+</i>	147	74	(76)	73	(76)		38	(68)	34	(87)	
<i>na¹</i>	2	1		1					1		
Fernmetastasen											
<i>M0</i>	179	93	(95)	86	(96)	0,9 [*]	49	(92)	36	(100)	0,04 [*]
<i>M1</i>	9	5	(5)	4	(4)		4	(8)	0	(0)	
<i>na¹</i>	8	1		7			3		4		
Klinisches Stadium											
<i>I-III</i>	60	33	(34)	27	(28)	0,4 [†]	20	(36)	7	(18)	0,05 [†]
<i>IV</i>	134	65	(66)	69	(72)		36	(64)	32	(82)	
<i>na¹</i>	2	1		1					1		
Primärtherapie											
<i>Operation</i>	125	59	(64)	66	(72)	0,3 [†]	33	(62)	32	(84)	0,02 [†]
<i>R/C²</i>	59	33	(36)	26	(28)		20	(38)	6	(16)	
<i>na¹</i>	12	7		5			3		2		
Tabak											
<i>Nichtraucher</i>	21	6	(6)	15	(16)	0,08 [†]	0	(0)	15	(38)	<0,001 [†]
<i>Ex-Raucher</i>	20	9	(9)	11	(11)		8	(14)	3	(8)	
<i>Raucher</i>	153	83	(85)	70	(73)		48	(86)	21	(54)	
<i>na¹</i>	2	1		1					1		
Alkohol											
<i>Abstinenz</i>	15	9	(9)	6	(6)	0,01 [†]	2	(4)	4	(10)	0,3 [†]
<i>Ex-Alkoholiker</i>	23	18	(19)	5	(5)		4	(7)	1	(3)	
<i>Konsument</i>	155	71	(72)	84	(89)		49	(89)	34	(87)	
<i>na¹</i>	3	1		2			1		1		
HPV Prävalenz ³											
<i>Studienperiode</i>											
<i>5/1990–7/1999</i>	98	62	(63)	36	(37)	<0,001 [†]	20	(36)	15	(37)	0,9 [†]
<i>8/1999–7/2008</i>	98	37	(37)	61	(63)		36	(64)	25	(63)	

¹Daten nicht vorhanden; ²Radio- und/oder Chemotherapie; ³Studienkohorte wurde in zwei Teile mit jeweils n=98 Patienten zerlegt; ⁴HPV16 DNA-negative OPSCC; ⁵HPV16 DNA-positive OPSCC; ⁶E6*I/E6*I-negative OPSCC plus E6*I/E6*I-positive OPSCC ohne RNA-Muster; ⁷HPV⁺ mit RNA-Mustern; signifikante p-Werte sind kursiv dargestellt; *exakter Test nach Fisher; [†]Chi-Quadrat-Test; [#]Wilcoxon-Rang-Test.

4.1.4 Überlebensanalysen

Patienten mit HPV-assoziierten Oropharynxtumoren zeigen ein besseres Überleben als Patienten mit HPV-negativen OPSCC (66, 68, 71, 81-83). Deshalb wurde das Überleben der Patienten, sowohl das Gesamt- (*overall survival*, OS) wie auch das progressionsfreie Überleben (*progression-free survival*, PFS) stratifiziert nach den viralen Markern DNA, Viruslast, E6*II/E6*I RNA und virale RNA-Muster analysiert, um das diagnostische und prognostische Potential dieser Marker zu prüfen.

4.1.4.1 Gesamtüberleben (OS)

Für die Berechnung des Gesamtüberlebens wurde für jeden Patienten die Zeitspanne ab dem Diagnose-Zeitpunkt des Primärtumors im Oropharynx bis zum Studienaustritt bestimmt. Den Studienaustritt stellte entweder das Todesdatum oder das Datum der letzten Vorstellung des Patienten in der Klinik oder beim niedergelassenen Facharzt dar. Patienten, die aus der Nachbeobachtung verloren gingen (*lost to follow-up*) oder tumorunabhängig verstorben waren, wurden als so genannte zensierte Beobachtungen gewertet, während Patienten, die in Folge ihres Oropharynxtumors verstorben waren, als Event gewertet wurden (siehe 3.9.3, Methodenteil). Die mediane Nachbeobachtungszeit des Patientenkollektivs dieser Studie betrug 8,5 Jahre (103 Monate).

Zunächst wurde das Gesamtüberleben des Patientenkollektivs abhängig der viralen Marker DNA, Viruslast, onkogener RNA und RNA-Mustern univariat mittels deskriptiver Kaplan-Meier Überlebenskurven dargestellt. Anschließend wurde das Gesamtüberleben durch multivariate Analysen (*Cox proportional Hazard models*) unter Berücksichtigung der anderen klinischen Einflussgrößen berechnet.

4.1.4.1.1 Univariate Analysen

Nach univariater Analyse ergab sich ein signifikanter Überlebensvorteil für die Patienten stratifiziert nach Viruslast, onkogener RNA und viraler RNA-Muster, nicht jedoch nach HPV16-DNA (Abbildung 4-11). Patienten der HPV⁺ Gruppe hatten einen nur leichten Überlebensvorteil gegenüber Patienten der HPV⁻ Gruppe: Im Vergleich zu den HPV⁻ Patienten hatten HPV⁺ Patienten eine ca. doppelt solange mediane Überlebenszeit (61 Monate für HPV⁺ vs. 26 Monate für HPV⁻, Tabelle 4-2) und der Anteil der tumorabhängig verstorbenen Patienten war etwas geringer (44% für HPV⁺ vs. 60% für HPV⁻, Tabelle 4-2). RNA⁺ Patienten hatten dagegen ein fast 5-fach längeres medianes Überleben als HPV⁻ Patienten. Bei HPV_{high} und RNA⁺/CxCa⁺ Patienten wurde der Zeitpunkt, an dem die Überlebenswahrscheinlichkeit der Patienten 50% beträgt, über den gesamten Beobachtungszeitraum nicht erreicht (Tabelle 4-2; Abbildung 4-11B+D). Auch die Anzahl der beobachteten

tumorabhängigen Todesfälle sank von 31% in der RNA⁺ Gruppe auf 24% bzw. 23% in den Gruppen HPV_{high} und RNA⁺/CxCa⁺.

Tab. 4-2 Gesamtüberleben der OPSCC Patienten nach HPV16 Status.

Parameter	n (total)	mediane Überlebens- zeit (Monate)	Events		p*
			n	%	
HPV ⁻	99	26	59	60	
HPV ⁺	97	61	43	44	0,06
HPV _{low}	64	44	35	55	
HPV _{high}	33	n.e.	8	24	0,02
RNA ⁻	48	34	28	58	
RNA ⁺	48	122	15	31	0,01
RNA ⁻ plus RNA ⁺ /CxCa ⁻	56	34	34	61	
RNA ⁺ /CxCa ⁺	40	n.e.	9	23	0,003

HPV⁻/HPV⁺, OPSCC negativ/positiv für HPV16 DNA; HPV_{low}/HPV_{high}, OPSCC mit niedriger/hoher Viruslast; RNA⁻, HPV⁺ OPSCC negativ für E6*I/E6*I RNA; RNA⁺, HPV⁺ OPSCC positiv für E6*I/E6*I RNA; RNA⁺/CxCa⁻, RNA⁺ OPSCC ohne RNA-Muster; RNA⁺/CxCa⁺, RNA⁺ OPSCC mit RNA-Muster; *Log-Rank-Test; n.e., nicht erreicht.

4.1.4.1.2 Multivariate Analysen

Im Gegensatz zur univariaten Kaplan-Meier Analyse, bei der allein der Einfluss des HPV-Status auf das Überleben des Patienten berücksichtigt wurde, berücksichtigten multivariate Analysen des Gesamtüberlebens neben dem HPV-Status auch andere Einflussgrößen. Das Gesamt- wie auch das progressionsfreie Überleben der Patienten ist bekanntermaßen von diversen anderen Faktoren, wie z. B. Alter oder Geschlecht, Tabak- und/oder Alkoholkonsum, Tumorstadium oder der Therapie abhängig. So ist allgemein bekannt, dass z. B. ältere verglichen mit jüngeren Patienten eine schlechtere Prognose (d. h. eine geringere Überlebenswahrscheinlichkeit) haben; ebenso Raucher oder Alkoholiker im Vergleich zu Nichtrauchern oder Nichttrinkern und Patienten mit fortgeschrittenen Tumorstadien (> Stadium III vs. Stadien I-III). Diese Einflussgrößen sollten in den folgenden Analysen berücksichtigt werden.

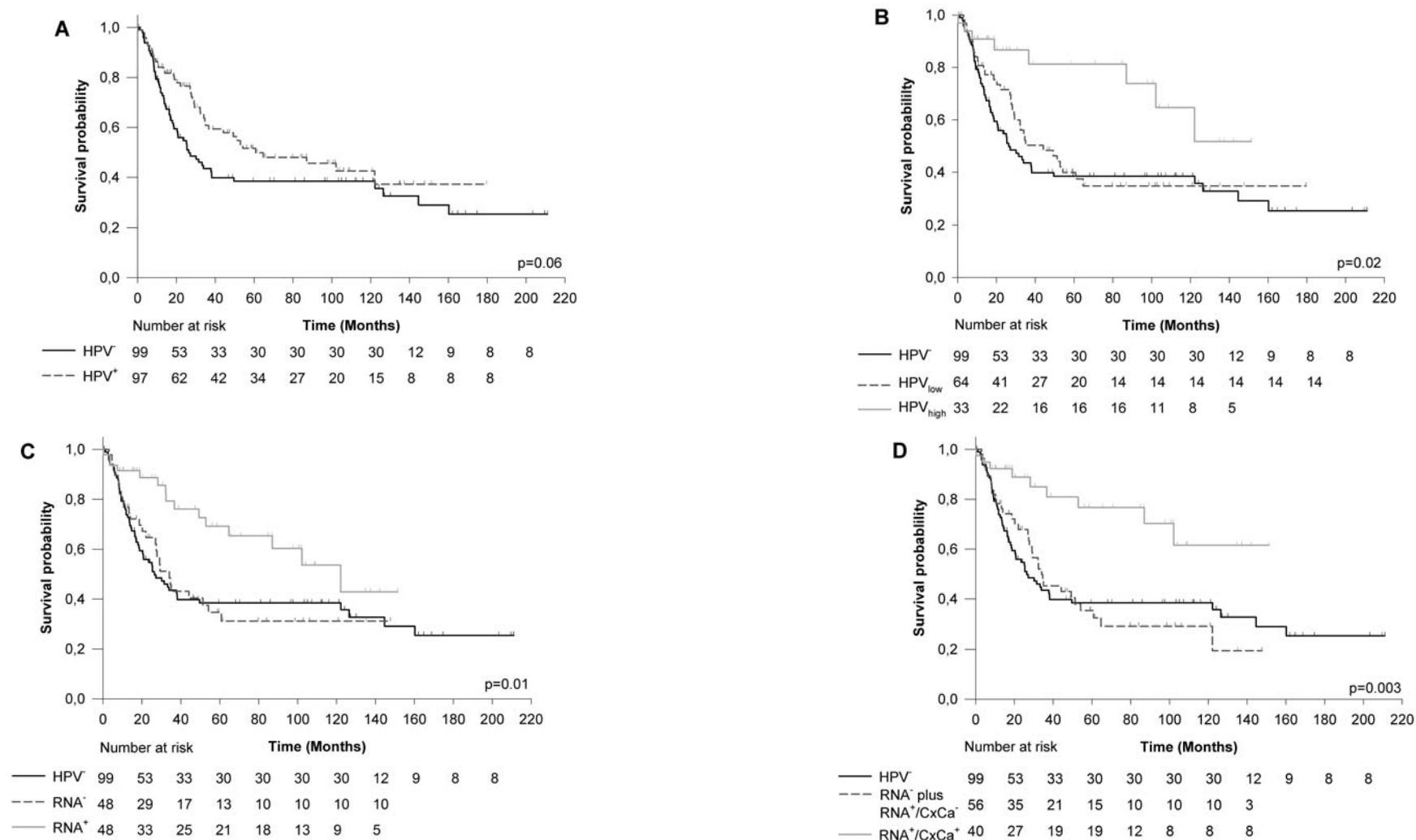


Abb. 4-11 Gesamtüberleben der OPSCC Patienten abhängig vom HPV16-Status. Die Patienten wurden nach den viralen Markern HPV16 DNA (A), Viruslast (B), E6*II/E6*I RNA (C) und RNA-Mustern (D) stratifiziert. HPV⁻, HPV DNA-negative OPSCC; HPV⁺, HPV16 DNA-positive OPSCC; HPV_{low}/HPV_{high}, OPSCC mit niedriger/hohem Viruslast; RNA⁻/RNA⁺, HPV⁻ OPSCC negativ/positiv für E6*II/E6*I RNA; (RNA⁺/CxCa⁻)/ (RNA⁺/CxCa⁺), HPV⁺ OPSCC ohne/mit RNA-Muster. Unterschiede zwischen den Überlebenskurven wurden durch den Log-Rank-Test bestimmt.

So genannte Cox-Modelle ermöglichten dabei, die Relevanz der vier viralen Marker (DNA, Viruslast, onkogene RNA und RNA-Muster) unter gleichzeitiger Berücksichtigung der anderen Einflussgrößen (Alter, Geschlecht, Tumorstadium, Tabak- und/oder Alkoholkonsum und Therapie) hinsichtlich des Gesamtüberlebens der Patienten zu bestimmen. Das Risiko am Tumor zu versterben wurde schließlich in der so genannten *Hazard Ratio* (HR) ausgedrückt. Bei einer HR=1,0 für eine Patientengruppe gab es keinen Unterschied zur Referenzgruppe; bei einer HR<1,0 hatte die Patientengruppe im Vergleich zur Referenzgruppe ein besseres Überleben und bei einer HR>1,0 hatte die Patientengruppe im Vergleich zur Referenzgruppe ein schlechteres Überleben.

Zunächst wurden die *Hazard Ratios* für die allgemeinen demographischen und klinischen Einflussgrößen Alter, Geschlecht, klinisches Stadium, Tabak- und Alkoholkonsum in einem gesonderten Modell berechnet (Tabelle 4-3). Wie erwartet waren hier vor allem das klinische Stadium und der Therapie-Status signifikante Einflussgrößen auf das Gesamtüberleben der Patienten. Patienten mit einem fortgeschrittenen Tumorstadium (Stadium IV) hatten ein um 79% signifikant erhöhtes Risiko am Tumor zu versterben (HR=1,79; 95%KI 1,03-3,12) im Vergleich zu Patienten mit weniger fortgeschrittenen Stadien (Stadium I-III). Des Weiteren hatten Patienten, die Radio- und/oder Chemotherapie als Erstbehandlung des Tumors erhalten hatten, ein um 125% signifikant erhöhtes Risiko zu versterben verglichen mit Patienten, die primär eine Tumorexzision erhalten hatten (HR=2,25; 95%KI 1,42-3,57). Auch für die anderen Faktoren konnten Einflüsse, wenn auch nicht signifikant, auf das Überleben beobachtet werden: Mit jedem Altersjahr erhöhte sich die Wahrscheinlichkeit zu versterben um jeweils 1%; Frauen hatten ein leicht erhöhtes Risiko gegenüber den Männern in dieser Studie und vor allem die Raucher und Alkoholkonsumenten hatten ein erhöhtes Risiko gegenüber Nichtrauchern und Nichttrinkern (Tabelle 4-3).

Anschließend wurden die *Hazard Ratios* für die viralen Marker adjustiert nach den oben genannten Einflussgrößen berechnet, wobei die Gruppe der HPV⁻ Patienten stets die Referenzgruppe darstellte (Tabelle 4-3). Analog zu den Kaplan-Meier Analysen, hatten HPV⁺ Patienten ein ähnliches Risiko zu versterben wie HPV⁻ Patienten (HR=0,68; 95%KI 0,45-1,04). E6*II/E6*I RNA ergab als Gesamtmodell betrachtet ebenfalls keinen signifikanten Unterschied, allerdings hatten RNA⁺ Patienten ein um 52% signifikant verringertes Sterberisiko (HR=0,48; p=0,06; 95%KI 0,26-0,89). Signifikante Unterschiede zur HPV⁻ Gruppe bestanden nur für Viruslast und virale RNA-Muster. HPV_{high} und RNA⁺/CxCa⁺ Patienten hatten ein um 67% bzw. 69% verringertes Sterberisiko verglichen mit HPV⁻ Patienten (Tabelle 4-3).

Tab. 4-3 Multivariate Analysen des Gesamtüberlebens.

Klinische und demographische Faktoren		HR	95% KI	p-Wert
Alter		1,01	0,81-1,25	0,9
Geschlecht (weiblich vs. männlich)		1,09	0,66-1,77	0,7
Klinisches Stadium (IV vs. I-III)		1,79	1,03-3,12	0,04
Therapie Status (R/C vs. OP)		2,25	1,42-3,57	<0,001
Tabakstatus				
Raucher vs. Nichtraucher		2,09	0,83-5,30	
Ex-Raucher vs. Nichtraucher		1,27	0,40-4,01	0,1
Alkoholkonsum				
Konsument vs. Abstinenz		1,22	0,48-3,10	
Ex-Alkoholiker vs. Abstinenz		1,24	0,42-3,62	0,9
HPV Marker	n	HR	95% KI	p-Wert
HPV ⁻ (Referenz)	99	1,00		
HPV ⁺	97	0,68	0,45-1,04	0,07
HPV ⁻ (Referenz)	99	1,00		
HPV _{low}	64	0,82	0,53-1,26	
HPV _{high}	33	0,33	0,15-0,76	0,03
HPV ⁻ (Referenz)	99	1,00		
RNA ⁻	48	0,90	0,56-1,44	
RNA ⁺	48	0,48	0,26-0,89	0,06
HPV ⁻ (Referenz)	99	1,00		
RNA ⁻ plus RNA ⁺ /CxCa ⁻	56	0,95	0,61-1,48	
RNA ⁺ /CxCa ⁺	40	0,31	0,14-0,68	0,01

HR, Hazard Ratio; KI, Konfidenzintervall. Die Modelle wurden adjustiert nach Alter, Geschlecht, klinischem Stadium, Therapie Status, Alkohol- und Tabakkonsum. Statistisch signifikante Werte sind fett dargestellt. Die p-Werte für die HPV Marker wurden jeweils für das gesamte Modell berechnet.

Die Marker Viruslast und virale RNA-Muster hatten demnach das größte Potential, um einen HPV-assoziierten Tumor zu identifizieren. Der Vorteil der viralen RNA-Muster gegenüber dem der Viruslast bestand lediglich in einer höheren Sensitivität: Während in der HPV_{high} Gruppe nur 33 Patienten eingeschlossen wurden, war es möglich durch die RNA-Muster 40 Patienten zu identifizieren.

4.1.4.2 Progressionsfreies Überleben (PFS)

Analog zum Gesamtüberleben, wurde für die Berechnung des progressionsfreien Überlebens die Zeitspanne ab dem Studieneintritt bis zum Datum einer Tumorprogression oder bis zur letzten Vorstellung des Patienten herangezogen. Progression war definiert als Auftreten eines oder mehrerer Folgeereignisse, wie Lymphknoten- oder Fernmetastase, Rezidiv oder Zweitkarzinom in der Kopf-Hals Region, sowie als Ableben eines Patienten infolge des Oropharynxtumors. Wie auch für das Gesamtüberleben wurde zunächst das PFS des Patientenkollektivs abhängig von den vier viralen Markern univariat mittels deskriptiver Kaplan-Meier Überlebenskurven dargestellt und anschließend der Einfluss der viralen Marker auf das PFS der Patienten durch multivariate Analysen (*Cox proportional Hazard models*) errechnet.

4.1.4.2.1 Univariate Analysen

Auch für das PFS ergab sich ein signifikanter Überlebensvorteil für die Patienten stratifiziert nach Viruslast, onkogener RNA und viralen RNA-Mustern. Ebenso wie für das OS konnte für HPV16 DNA allein kein signifikanter Unterschied zwischen HPV⁺ und HPV⁻ Patienten festgestellt werden (Abbildung 4-12). HPV⁺ Patienten hatten einen nur leichten Vorteil gegenüber HPV⁻ Patienten bezüglich ihres progressionsfreien Überlebens: Insgesamt erlitten unter den HPV⁺ Patienten 53% (51/97) eine Tumorprogression, im Mittel erfolgte die Diagnose nach 37 Monaten, während unter den HPV⁻ Patienten 65% (64/99) eine Progression aufwiesen und diese im Mittel schon nach nur 14 Monaten auftrat (Tabelle 4-4). Bei den Patienten der RNA⁺ Gruppe wurde dagegen bei 44% (21/48) der Patienten eine Tumorprogression im Mittel nach 55 Monaten festgestellt. Die Stratifizierung nach Viruslast oder nach viralen RNA-Mustern ergab wie auch für das Gesamtüberleben den größten Überlebensvorteil für die Patienten: 33% (11/33) der HPV_{high} Patienten erlitten eine Progression und sie hatten eine mediane Überlebenszeit von 122 Monaten, während 35% (14/40) der RNA⁺/CxCa⁺ Patienten eine Progression erfuhren; der Zeitpunkt, an dem die Wahrscheinlichkeit eines progressionsfreien Überlebens der Patienten nur noch 50% beträgt, wurde jedoch über den gesamten Beobachtungszeitraum nicht erreicht (Abbildung 4-12B+D).

Tab. 4-4 Progressionsfreies Überleben der OPSCC Patienten nach HPV16 Status.

Parameter	n (total)	Mediane Überlebens- zeit (Monate)	Events		p*
			n	%	
HPV ⁻	99	14	64	65	0.09
HPV ⁺	97	37	51	53	
HPV _{low}	64	26	40	63	
HPV _{high}	33	122	11	33	0.02
RNA ⁻	48	21	29	60	
RNA ⁺	48	55	21	44	
RNA ⁻ plus RNA ⁺ /CxCa ⁻	56	23	36	64	0.04
RNA ⁺ /CxCa ⁺	40	n.e.	14	35	

HPV⁻/HPV⁺, OPSCC negativ/positiv für HPV16 DNA; HPV_{low}/HPV_{high}, OPSCC mit niedriger/ hoher Viruslast; RNA⁻, negativ für E6*II/E6*I RNA; RNA⁺, positiv für E6*II/E6*I RNA; RNA⁺/CxCa⁻, ohne RNA-Muster; RNA⁺/CxCa⁺, mit RNA Mustern;

*Log-Rank-Test; n.e., nicht erreicht.

4.1.4.2.2 Multivariate Analysen

Auch für das PFS wurde der Einfluss der viralen Marker unter Berücksichtigung der anderen Einflussgrößen (Alter, Geschlecht, klinisches Stadium, Tabak- und Alkoholkonsum, Therapie Status) durch Cox-Regressions Modelle bestimmt.

Zunächst wurden die *Hazard Ratios* für die allgemeinen demographischen und klinischen Einflussgrößen berechnet, die hier das Risiko der Patienten angeben, eine Tumorprogression zu erleiden (Tabelle 4-5).

Ein signifikanter Einfluss auf das PFS der Patienten war vor allem für den Therapie-Status und den Tabakkonsum gegeben. Patienten, die Radio- und/oder Chemotherapie als Erstbehandlung ihrer Tumorerkrankung erhielten, hatten ein um 89% signifikant erhöhtes Risiko eine Tumorprogression zu erfahren, als Patienten, die zuerst operiert wurden (HR=1,89; 95%KI 1,22-2,91). Außerdem hatten Raucher ein um 152% erhöhtes Progressions-Risiko gegenüber Nichtrauchern (HR=2,52; 95%KI 1,08-5,92). Die anderen Faktoren zeigten nur tendenziellen Einfluss: Das Tumorprogressions-Risiko stieg mit jedem Lebensjahr um jeweils 1% an; Frauen hatten ein leicht verringertes Risiko gegenüber Männern und Patienten mit fortgeschrittenem klinischem Tumorstadium (Stadium IV) hatten ein höheres Risiko als Patienten mit Stadium I-III. Patienten, die Alkohol konsumierten bzw. Ex-Alkoholiker waren, hatten ebenso ein erhöhtes Tumorprogressions-Risiko (Tabelle 4-5).

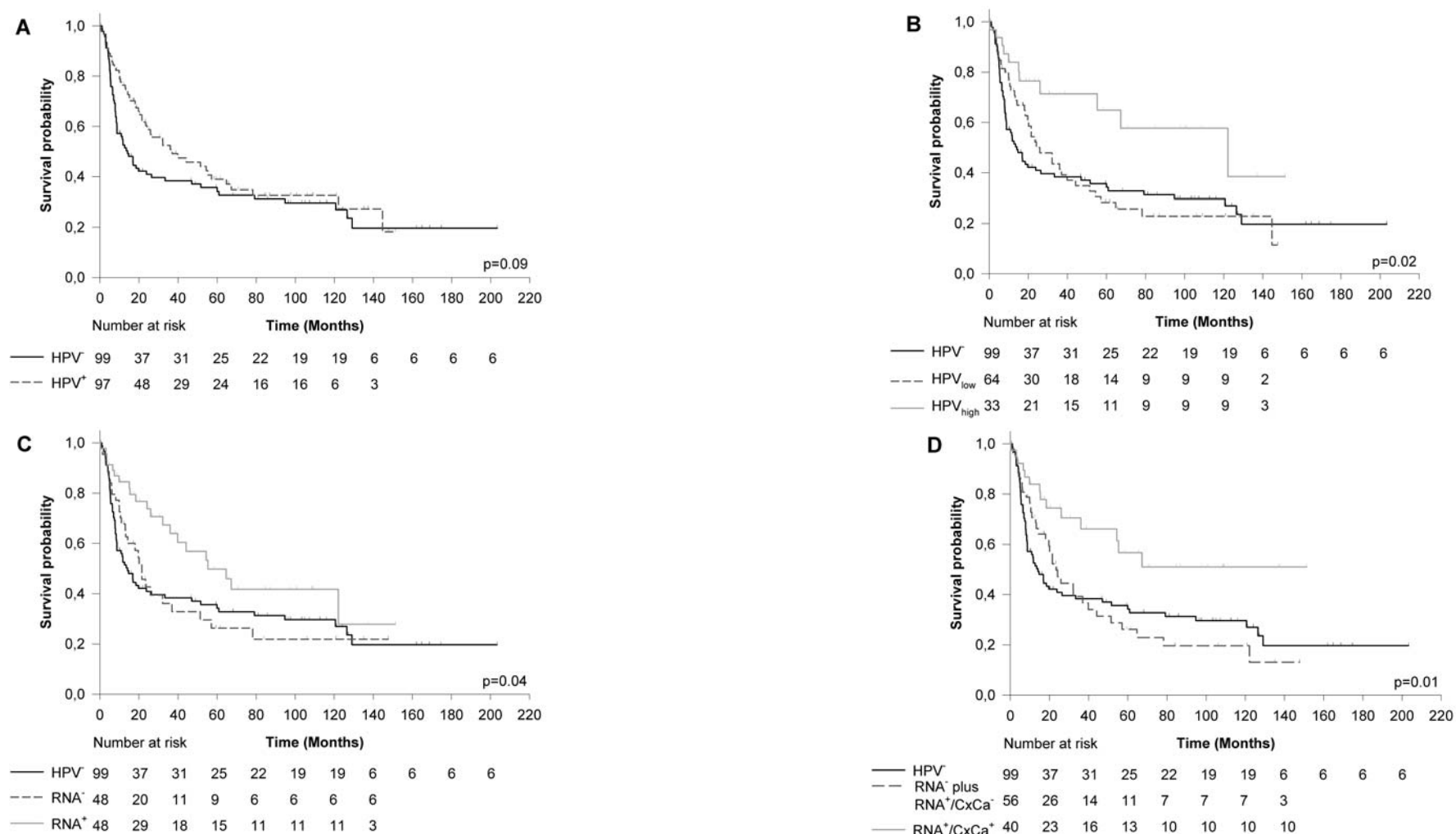


Abb. 4-12 Progressionsfreies Überleben der OPSCC Patienten abhängig vom HPV16-Status. Die Patienten wurden nach den viralen Markern HPV16 DNA (A), Viruslast (B), E6*I/E6*I RNA (C) und RNA-Muster (D) stratifiziert. HPV⁻, HPV DNA-negative OPSCC; HPV⁺, HPV16 DNA-positive OPSCC; HPV_{low}/HPV_{high}, OPSCC mit niedriger/hocher Viruslast; RNA⁻/RNA⁺, HPV⁺ OPSCC negativ/positiv für E6*I/E6*I RNA; (RNA⁺/CxCa⁻)/(RNA⁺/CxCa⁺), HPV⁺ OPSCC ohne/mit RNA-Muster. Unterschiede zwischen den Überlebenskurven wurden durch den Log-Rank-Test bestimmt.

Für die viralen Marker ergab sich analog zur univariaten PFS-Analyse und zur OS-Analyse kein signifikanter Unterschied zwischen HPV⁺ und HPV⁻ Patienten bezüglich ihres progressionsfreien Überlebens (HR=0,77; 95%KI 0,53-1,12). Auch die Gesamtmodelle für die anderen Marker ergaben keine signifikanten Unterschiede, jedoch wurde für die Gruppen HPV_{high} und RNA⁺/CxCa⁺ ein signifikant verringertes Tumorprogressions-Risiko berechnet. HPV_{high} Patienten hatten ein um 54% und RNA⁺/CxCa⁺ ein um 41% verringertes Risiko gegenüber den HPV⁻ Patienten (Tabelle 4-5).

Tab. 4-5 Multivariate Analysen des progressionsfreien Überlebens.

Klinische und demographische Faktoren		HR	95% KI	p-Wert
Alter		1,01	0,83-1,23	0,9
Geschlecht (weiblich vs. männlich)		0,93	0,60-1,44	0,7
Klinisches Stadium (IV vs. I-III)		1,30	0,82-2,07	0,3
Therapie Status (R/C vs. OP)		1,89	1,22-2,91	0,004
Tabakstatus				
Raucher vs. Nichtraucher		2,52	1,08-5,92	
Ex-Raucher vs. Nichtraucher		1,39	0,49-3,90	0,03
Alkoholkonsum				
Konsument vs. Abstinenz		1,10	0,49-2,56	
Ex-Alkoholiker vs. Abstinenz		1,18	0,45-3,11	0,9
HPV Marker	n	HR	95% KI	p-Wert
HPV ⁻ (Referenz)	99	1,00		
HPV ⁺	97	0,77	0,53-1,12	0,2
HPV ⁻ (Referenz)	99	1,00		
HPV _{low}	64	0,88	0,60-1,30	
HPV _{high}	33	0,46	0,23-0,92	0,09
HPV ⁻ (Referenz)	99	1,00		
RNA ⁻	48	0,90	0,58-1,40	
RNA ⁺	48	0,63	0,37-1,06	0,2
HPV ⁻ (Referenz)	99	1,00		
RNA ⁻ plus RNA ⁺ /CxCa ⁻	56	0,93	0,61-1,40	
RNA ⁺ /CxCa ⁺	40	0,51	0,27-0,95	0,1

HR, Hazard Ratio; KI, Konfidenzintervall; R/C, Radio- und/oder Chemotherapie. Die Modelle wurden adjustiert nach Alter, Geschlecht, klinischem Stadium, Therapie Status, Alkohol- und Tabakkonsum. Statistisch signifikante Werte sind fett dargestellt. Die p-Werte für die HPV Marker wurden jeweils für das gesamte Modell berechnet.

Analog zum OS hatten auch beim PFS die Marker Viruslast und virale RNA-Muster das größte Potential, einen HPV-assoziierten Tumor zu identifizieren. Wiederum lag der Vorteil des Markers RNA-Muster gegenüber dem des Markers Viruslast in einer höheren Sensitivität. Während durch eine hohe Viruslast 33 Patienten identifiziert wurden, waren es durch die RNA-Muster 40 Patienten.

4.2 Analysen an Formalin-fixiertem und in Paraffin-eingebettetem Tumormaterial

In diesem Teil der Arbeit wurde untersucht, ob Oropharynxtumoren mit aktiver HPV16-Beteiligung durch die HPV16 Fluoreszenz *In-Situ* Hybridisierung (FISH) oder durch mögliche zelluläre Proteinmarker identifiziert werden können. Da eine zuverlässige Identifizierung der HPV-assoziierten Tumoren auf RNA-Ebene zumindest bislang nur an frisch-gefrorenem Tumormaterial möglich und zudem recht kompliziert, zeitaufwendig und kostenintensiv ist, wären zelluläre Proteinmarker sowie die FISH für die Identifizierung von HPV-assoziierten OPSCC von großem Nutzen. Die FISH und die immunhistochemischen Analysen stellen eine praktikable, kostengünstige und schnelle Methode für die Routinediagnostik dar, insbesondere werden sie an Formalin-fixiertem und in Paraffin-eingebettetem (FFPE) Material durchgeführt, wie es routinemäßig zur Archivierung der Biopsien präpariert wird und somit an allen Kliniken in dieser Form zur Verfügung steht.

4.2.1 Fluoreszenz In-Situ Hybridisierung zur Analyse der Virus-DNA

Der Einsatz der Fluoreszenz *In-Situ* Hybridisierung (FISH) mit HPV16-Sonden war für die hier vorgelegte Arbeit ursprünglich nicht geplant, da die Methodik im Vergleich zur PCR wesentlich weniger sensitiv ist und eine quantitative Analyse nicht möglich ist. Die FISH wird aber vor allem in nordamerikanischen Studien häufig als einzige Methode benutzt, um HPV-assoziierte Kopf-Hals Tumoren zu identifizieren (68, 75, 81-83, 111, 113, 120, 131, 132). Daher wurde nach Abschluss der bis hier beschriebenen Untersuchungen beschlossen, die FISH an dem für die immunhistochemischen Analysen angefertigten Gewebechip einzusetzen. Es sollte untersucht werden, wie die FISH im Vergleich zu den oben beschriebenen DNA- und RNA-Analysen bezüglich Sensitivität und Spezifität abschneidet, um HPV-assoziierte OPSCC mit aktiver HPV-Beteiligung zu identifizieren. Aus zeitlichen Gründen wurde dieser Teil der Arbeit nicht im Labor in Heidelberg durchgeführt, sondern während eines Aufenthalts im Labor von Dr. Ernst-Jan Speel, Abteilung Molekulare Zellbiologie an der Universität in Maastricht/UMC, Niederlande. Die FISH mit HPV16-Sonden ist bei den Kollegen in Maastricht, mit denen wir seit mehreren Jahren kollaborieren (133), etabliert.

Von den Kollegen aus Maastricht wurde auch beschrieben, dass es möglich sei, mit Hilfe der FISH zwischen integrierten und episomalen HPV Genomen in den Tumorzellen zu unterscheiden. Markante punktuelle Hybridisierungssignale wurden als integrierte HPV16 Genome interpretiert, diffuse und granuläre Signale dagegen als episomales HPV16 (41, 114, 134-138).

Die Auswertungen der FISH am Gewebechip wurden dokumentiert und mit den viralen RNA-Mustern verglichen, die ebenfalls Hinweise zum physikalischen Status des HPV16-Genoms im Tumor lieferten (siehe 4.1.2.2, Ergebnisteil).

Wie erwähnt, wurde die FISH am Gewebechip durchgeführt, auf dem 188/199 OPSCC und fünf Kontrollen (gesunde Uvula-Schleimhaut) zusammen vereinigt waren. Die Stratifizierung der 188 Tumoren nach HPV DNA- und RNA-Status ist in Abbildung 4-13 dargestellt. Die Ergebnisse der FISH wurden als Scores ausgedrückt (siehe 3.7.7, Methodenteil). Somit war anschließend eine Korrelation mit anderen Parametern dieser Arbeit schnell und einfach möglich.

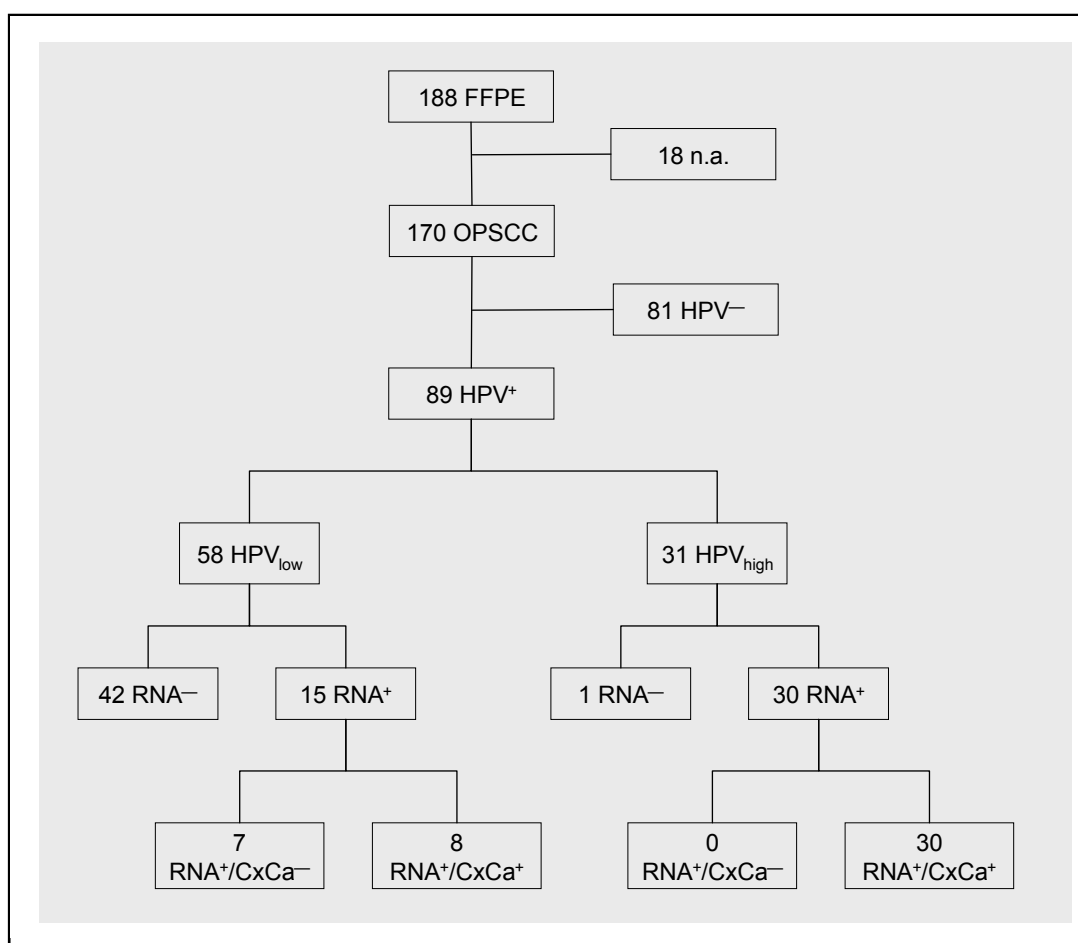


Abb. 4-13 Übersicht über die OPSCC Stratifizierungen nach DNA- und RNA-Status für die FISH-Analysen. HPV⁻, HPV DNA-negative OPSCC; HPV⁺, HPV16 DNA-positive OPSCC; HPV_{low}/HPV_{high}, OPSCC mit niedriger/hocher Viruslast; RNA⁻, HPV16 DNA-positive, aber E6*II/E6*I RNA-negative OPSCC; RNA⁺, HPV16 DNA- und E6*II/E6*I RNA-positive OPSCC; RNA⁺/CxCa⁻, HPV16 DNA- und E6*II/E6*I RNA-positive OPSCC, aber ohne virale RNA-Muster; RNA⁺/CxCa⁺, HPV16 DNA- und E6*II/E6*I RNA-positive OPSCC mit viralen RNA-Mustern; n.a., nicht auswertbar. 1 HPV_{low} OPSCC war aufgrund ungenügenden Biopsiematerials von den RNA Analysen ausgeschlossen.

Insgesamt waren 170/188 (90%) Tumoren auswertbar. 79% (134/170) der OPSCC-Fälle wurden HPV16 FISH-negativ (FISH⁻) gewertet; 36/170 (21%) OPSCC waren dementsprechend FISH-positiv (FISH⁺).

Unter den 81 HPV⁻ Tumoren, analysiert durch MPG, waren 79 Tumoren (98%) ebenfalls FISH⁻, jedoch auch 2 Tumoren (2%) FISH⁺. Unter den 89 HPV⁺ Tumoren waren dagegen 55 FISH⁻ (62%) und nur 34 FISH⁺ (38%; Abbildung 4-14).

Durch die FISH wurden nicht ausschließlich HPV_{high} Tumoren detektiert, sondern es wurden auch 10/58 (17%) HPV_{low} Tumoren FISH⁺ bewertet. Von den Tumoren mit biologisch aktivem HPV16 wurden 62% (28/45; RNA⁺) bzw. 71% (27/38; RNA⁺/CxCa⁺) durch die FISH detektiert. Allerdings wurden jeweils 14% (6/42 RNA⁻ bzw. 7/49 RNA⁻ plus RNA⁺/CxCa⁻) der Tumoren ohne aktive HPV16-Beteiligung ebenso als FISH⁺ bewertet.

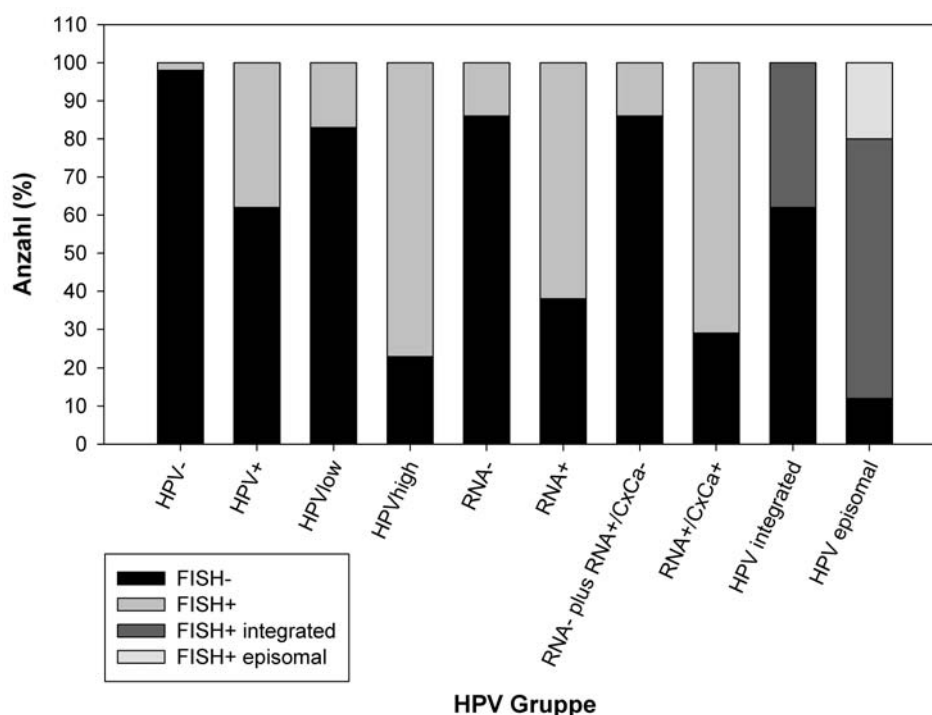


Abb. 4-14 HPV16 FISH-Ergebnisse nach HPV16 DNA- und RNA-Status. Tumoren, die nach FISH-Analyse HPV16-negativ waren, sind schwarz dargestellt (FISH⁻). Tumoren, die nach FISH-Analyse HPV16-positiv waren, sind grau dargestellt (FISH⁺). FISH-positive Tumoren mit integriertem HPV16 sind dunkelgrau (FISH⁺ integrated), FISH-positive Tumoren mit episomalem HPV16 sind hellgrau dargestellt (FISH⁺ episomal).

Insgesamt zeigten 31/36 (86%) Tumoren die charakteristischen punktuellen Signale, d. h. hier lagen die Virusgenome potentiell integriert vor, während für nur 5 Tumoren das granuläre, diffuse Signal wahrgenommen wurde. Bei den 5/36 (14%) OPSCC lag das Virusgenom dementsprechend in episomaler Form vor.

Von 13 Tumoren mit potentiell integrierten HPV16 Genomen, ermittelt durch das RNA Muster-1, wurde bei 5 Tumoren (38%) durch die FISH ebenso die Integration des Virusgenoms festgestellt (Abbildung 4-14). Diese Tumoren zeigten die für die Integration typischen markanten Punkte (Abbildung 4-15A). Bei nur 5/25 (20%) Tumoren, die durch das RNA Muster-2 ermittelt wurden, konnten die episomal vorliegenden HPV16 Genome bestätigt werden (Abbildung 4-14). Bei diesen Tumoren wurde das diffus-granuläre Muster detektiert (Abbildung 4-15B). Rechnerisch wurde dementsprechend eine verhältnismäßig schwache positive Korrelation zwischen dem physikalischen Status des HPV Genoms nach der Analyse der RNA-Muster und dem der FISH-Analyse bestimmt ($r=0,59$; $p<0,001$; *Spearman's rank correlation*).

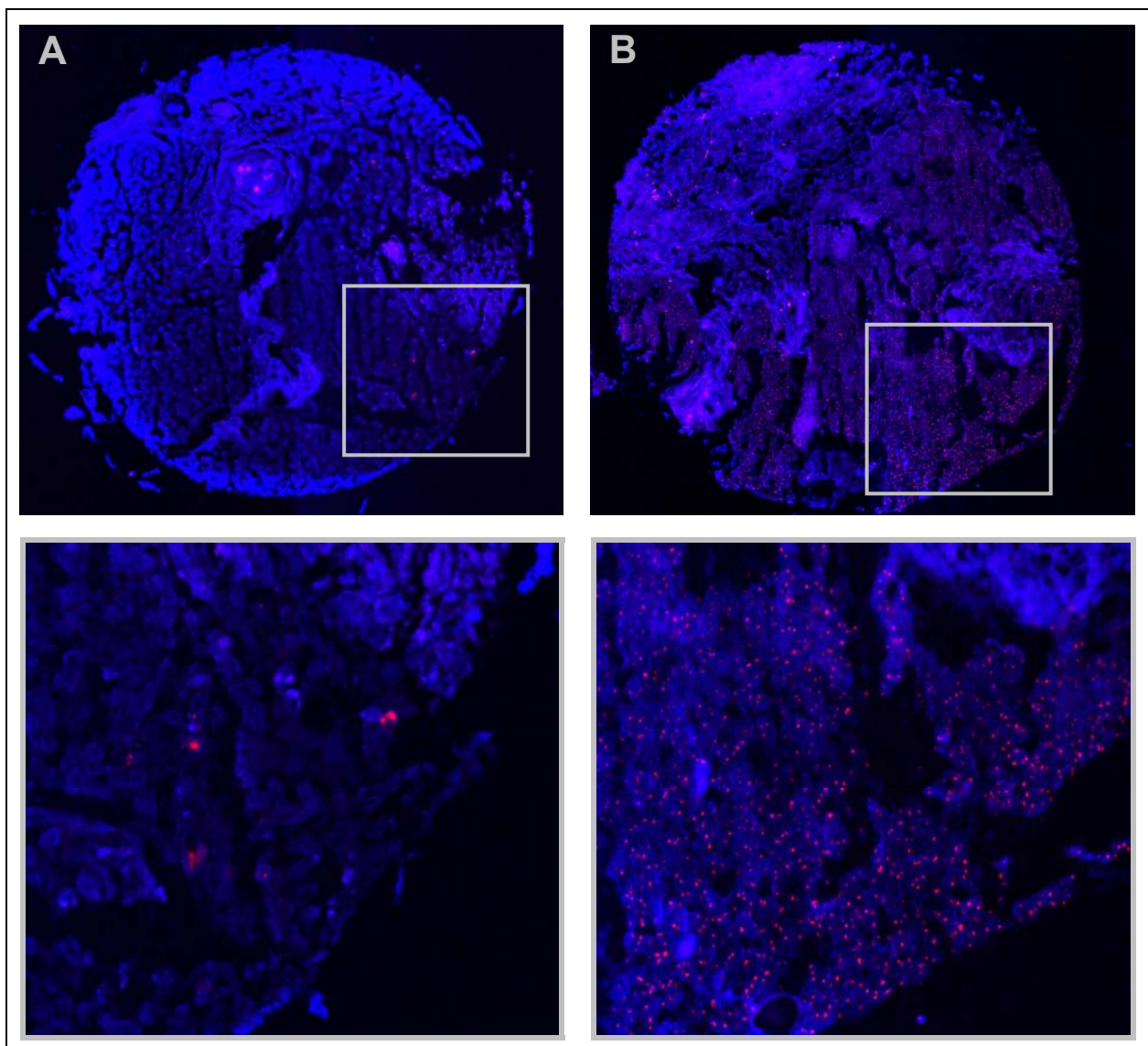


Abb. 4-15 HPV16 FISH bei HPV⁺ OPSCC.

A, episomales HPV16 Genom; B, integriertes HPV16 Genom; Aufnahmen jeweils mit 10-fach bzw. 40-fach Objektiv.

4.2.2 Immunhistochemie zur Analyse zellulärer Proteinmarker

Zentrale Marker bei der Immunhistochemie (IHC) waren die Proteine p53 und pRb, da diese durch die aktive Expression und Interaktion der viralen E6 und E7 Proteine direkt inhibiert werden (siehe 1.3.3, Einleitungsteil). Zusätzlich wurden Proteine des pRb-Signalwegs, p16^{INK4a} und Cyclin D1, untersucht, die als Folge der Inhibierung von pRb durch HPV16 ebenso veränderte Proteinexpressionsmuster aufweisen sollten. Analog zu den viralen Markern wurde im Anschluss an die immunhistochemischen Analysen das Potential der zellulären Proteinmarker bestimmt, einen HPV-assoziierten OPSCC zu identifizieren. Als Maß für die Relevanz eines Markers wurde erneut das Überleben der Patienten herangezogen.

Zum Nachweis der zellulären Proteinexpression wurden immunhistochemische Färbungen mit Antikörpern gegen pRb, p16^{INK4a}, Cyclin D1 und p53 am Gewebechip (*tissue micro array*, TMA, siehe 3.6, Methodenteil) unter Verwendung zwei verschiedener Nachweissysteme (ImmPRESSTM und TSATM, siehe 3.8.1, Methodenteil) durchgeführt. Für die Färbungen wurden die FFPE-Gewebeblöcke aus der Pathologie der Universität Heidelberg bezogen. Von den 199 Patienten dieser Studie standen 188 FFPE-Gewebeblöcke zur Verfügung. Als Referenz wurden die Proteine auch an Schnitten von fünf Schleimhäuten des Oropharynx von Nicht-Tumorpatienten immunhistochemisch gefärbt.

Die Einzelergebnisse der Färbungen wurden für jeden Patienten als Score ausgedrückt (siehe 3.8.2, Methodenteil). Dies hatte den Vorteil, dass die Auswertungen der Analyse direkt und unkompliziert mit anderen Parametern, die in dieser Arbeit generiert wurden, verglichen werden konnten.

Aufgrund der vorhergehenden Ergebnisse der DNA- und RNA-Analysen (siehe 4.1, Ergebnisteil), wurde die Analyse der viralen RNA-Muster in HPV⁺ Tumoren als so genannter Goldstandard für die Identifizierung HPV-assoziiierter Tumoren betrachtet. Dementsprechend wurde das Kollektiv aus 188 Tumoren für die folgenden Untersuchungen stratifiziert: Die HPV⁻ Gruppe umfasste 93, die Gruppe der Tumoren ohne E6*II oder E6*I Expression oder ohne die viralen RNA-Muster umfasste 55 (zur Vereinfachung im Folgenden als RNA⁻ abgekürzt) und die RNA⁺/CxCa⁺ Gruppe umfasste 40 Tumoren (Abbildung 4-16).

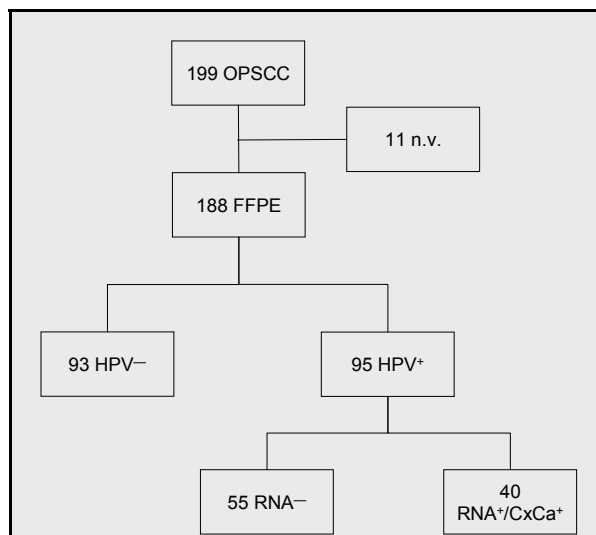


Abb. 4-16 Übersicht der OPSCC Patienten stratifiziert nach RNA⁺/CxCa⁺ für die Analyse der zellulären Proteinmarker.

n.v., nicht verfügbar; FFPE, in Formalin-fixiert und in Paraffin-eingebette Tumorböcke; HPV⁻, HPV DNA-negative OPSCC; HPV⁺, HPV16 DNA-positive OPSCC; RNA⁻, OPSCC ohne E6*I/E6*I Expression oder ohne RNA-Muster; RNA⁺/CxCa⁺, OPSCC mit RNA-Mustern.

Es war nun von Interesse zu untersuchen, ob die HPV⁺ Tumoren ohne E6* Expression und/oder ohne virale RNA-Muster sich auch bezüglich der Expression der zellulären Proteinmarker wie HPV⁻ Tumoren verhielten.

Um die prognostische Relevanz der einzelnen IHC-Marker zu bestimmen, wurden die Assoziationen der entsprechenden Proteinmuster mit dem Gesamtüberleben der Patienten uni- und multivariat analysiert.

4.2.2.1 Proteinexpression und deren Prävalenz in den HPV Gruppen

Die gesunde Oropharynx-Schleimhaut zeigte die typische niedrige Expression der Proteine p16^{INK4a}, Cyclin D1 und p53, die nur durch eine Signalverstärkung mit Tyramid (TSA) visualisiert werden konnte (für p53 in Abbildung 3-5, Kapitel 3.8, Methodenteil dargestellt), während pRb dagegen die typisch starke Expression zeigte (Abbildung 3-6, Kapitel 3.8, Methodenteil).

In den Tumoren wurde wie bereits bekannt häufig eine aberrante Expression der untersuchten zellulären Proteine beobachtet: Von den 188 OPSCC zeigten 54 (31%) eine erhöhte p16^{INK4a}-Expression, weitere 54 (29%) zeigten ein niedriges pRb-Expressionslevel und 78 (44%) bzw. 83 (45%) zeigten ein erhöhtes Expressionslevel von Cyclin D1 und p53 (Tabelle 4-6).

Insgesamt zeigte die Mehrheit der HPV⁻ OPSCC einen Verlust der p16^{INK4a}-Expression, ein normales Expressionslevel für pRb und eine starke Expression sowohl von Cyclin D1 als auch von p53 (Abb. 4-18A). RNA⁺/CxCa⁺ Tumoren waren dagegen hauptsächlich durch hohe p16^{INK4a}, niedrige pRb und normale p53 Expressionslevel charakterisiert. Zudem wurde Cyclin D1 in diesen Tumoren entweder gar nicht oder auf normal niedrigem Level exprimiert (Abb. 4-18B). Das Proteinexpressionsmuster in den RNA⁻ Tumoren war wiederum dem der HPV⁻ Tumoren recht ähnlich; hier wurde die Gruppe hauptsächlich durch normale p16^{INK4a} und pRb, sowie durch hohe Cyclin D1 und p53 Expressionslevel charakterisiert (Tab. 4-6).

Tab. 4-6 Expressionslevel der zellulären Proteinmarker in den OPSCC nach HPV16 Status.

Expressionslevel der zellulären Proteine	Total n=188		HPV ⁻² n=93		RNA ⁻³ n=55		RNA ⁺ /CxCa ⁺ 4 n=40	
	n	(%)	n	(%)	n	(%)	n	(%)
p16^{INK4a}								
Expressionsverlust	72	(41)	49	(58)	19	(37)	4	(10)
normal	50	(28)	24	(28)	22	(42)	4	(10)
hoch	54	(31)	12	(14)	11	(21)	31	(80)
na ¹	12		8		3		1	
pRb								
niedrig	54	(29)	10	(11)	10	(18)	34	(85)
normal	132	(71)	81	(89)	45	(82)	6	(15)
na ¹	2		2		0		0	
Cyclin D1								
Expressionsverlust	42	(24)	11	(13)	9	(17)	22	(55)
normal	57	(32)	26	(31)	15	(29)	16	(40)
hoch	78	(44)	48	(56)	28	(54)	2	(5)
na ¹	11		8		3		0	
p53								
Expressionsverlust	44	(24)	28	(31)	11	(21)	5	(12)
normal	56	(31)	18	(20)	9	(17)	29	(73)
hoch	83	(45)	44	(49)	33	(62)	6	(15)
na ¹	5		3		2		0	

¹nicht auswertbar; ²HPV DNA-negative Tumoren; ³HPV16 DNA-positive Tumoren ohne RNA-Muster;

⁴HPV16 DNA-positive Tumoren mit RNA-Muster.

Da die Verteilung der Expressionslevel ‚keine Expression‘ und ‚normal‘ für die Marker p16^{INK4a} und Cyclin D1 in der RNA⁺/CxCa⁺ Gruppe sehr gleichmäßig war (Tab. 4-6), wurden diese beiden Levels für die folgenden Analysen zu einem Level ‚niedrig‘ zusammengefasst.

Die HPV⁻ und RNA⁺/CxCa⁺ OPSCCs unterschieden sich häufig auch in ihrer Histologie (Abb. 4-17). Die RNA⁺/CxCa⁺ Tumoren waren typischerweise nur wenig differenziert; die Keratinisierung der Tumorzellen bleibt bei diesen Tumoren meist aus. Zusätzlich zeigten diese Tumoren häufig eine Morphologie, die für die basaloide Kopf-Hals Tumoren typisch ist. Im Gegensatz dazu waren HPV-negative Tumoren meist gut differenziert und keratinisiert (Abb. 4-17C). Obwohl die basaloide Morphologie häufiger bei den HPV-assoziierten OPSCC

anzutreffen ist, gibt es auch unter den HPV-negativen Tumoren mit typischen Protein-expressionsmustern diese Morphologie (Abb. 4-18A).

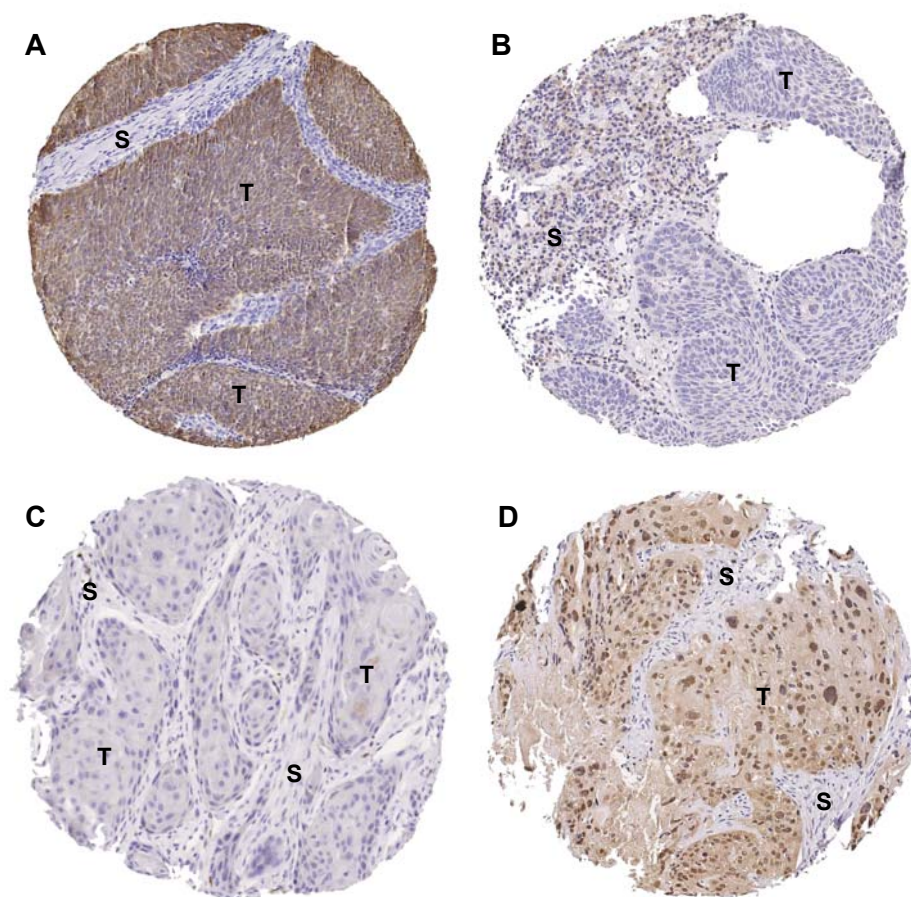


Abb. 4-17 Beispiele für p16^{INK4a}-Proteinexpressionslevel in den OPSCC.

A, typischer RNA⁺/CxCa⁺ OPSCC mit hohem p16^{INK4a}-Expressionslevel (Score 2, Überexpression). B, untypischer RNA⁺/CxCa⁺ OPSCC mit niedrigem p16^{INK4a}-Expressionslevel (Score 0, Expressionsverlust nach TSA-IHC). C, typischer HPV⁻ OPSCC mit niedrigem p16^{INK4a}-Expressionslevel (Score 0, Expressionsverlust nach TSA-IHC). D, untypischer HPV⁻ OPSCC mit hohem p16^{INK4a}-Expressionslevel (Score 2, Überexpression). Aufnahmen jeweils mit 10-fach Objektiv.

Die typischen Proteinexpressionsmuster für HPV⁻ und RNA⁺/CxCa⁺ Tumoren ließen sich außerdem durch eine Clusteranalyse deutlich machen. Die Proteinexpressionsmuster wurden dafür nach den Parametern HPV16 DNA, Viruslast und RNA-Muster „geclustert“ und anschließend graphisch dargestellt (Abbildung 4-19). Zum einen ist die Überlappung zwischen den Gruppen HPV_{low} und RNA⁻ (blau und hellblau), sowie zwischen den Gruppen HPV_{high} und RNA⁺/CxCa⁺ (violett und hellviolett) sehr deutlich zu erkennen. Andererseits werden die unterschiedlichen Expressionsprofile zwischen den Gruppen RNA⁺/CxCa⁺ und HPV⁻, sowie die ähnlichen Expressionsprofile der RNA⁻ und der HPV⁻ Gruppe durch die unterschiedliche Farbgebung (rot, hohe Expressionslevel; schwarz, niedrige oder keine Expressionslevel) sehr gut veranschaulicht.

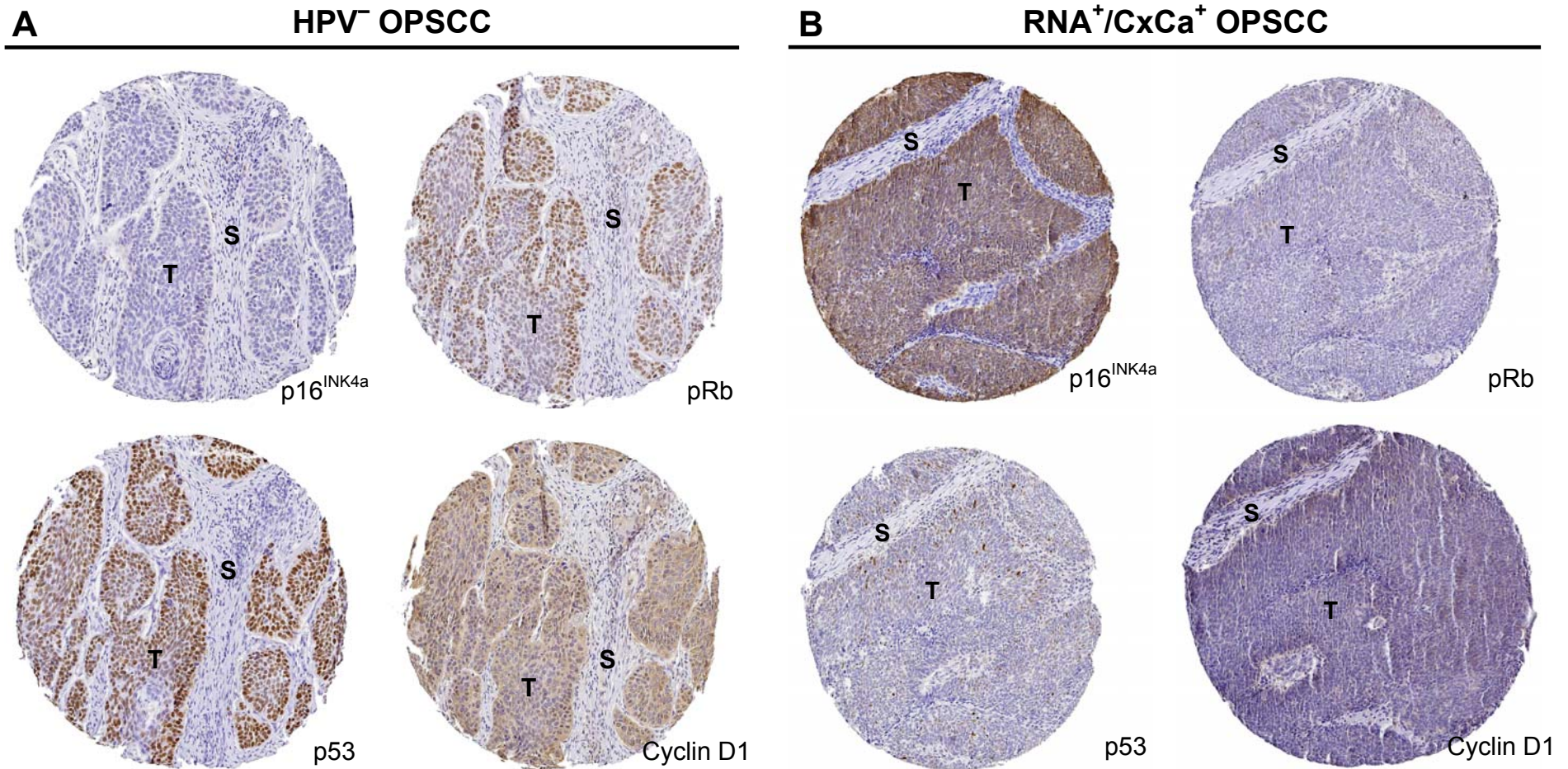


Abb. 4-18 Typische Proteinexpressionsmuster für HPV⁻ (A) und RNA⁺/CxCa⁺ (B) OPSCC. Der HPV⁻ OPSCC wurde mit Score 0 für p16^{INK4a} (trotz TSA keine Färbung; aberrant im Vergleich zur Referenzfärbung der Schleimhaut) und Score 2 (starke Färbung) für die Proteine pRb (normale Färbung im Vergleich zur Schleimhaut), p53 (aberrant, Überexpression) und Cyclin D1 (aberrant, Überexpression) bewertet. Der RNA⁺/CxCa⁺ OPSCC dagegen wurde mit Score 2 für p16^{INK4a} (aberrant, Überexpression) und jeweils mit Score 1 (leichte Färbung, sichtbar nur nach TSA-IHC) für die Proteine p53 (normale Expression) und Cyclin D1 (normale Expression), sowie Score 1 für pRb (niedrige Expression im Vergleich zur Schleimhaut) bewertet. Aufnahmen jeweils mit 10-fach Objektiv; T, Tumor; S, Stroma.

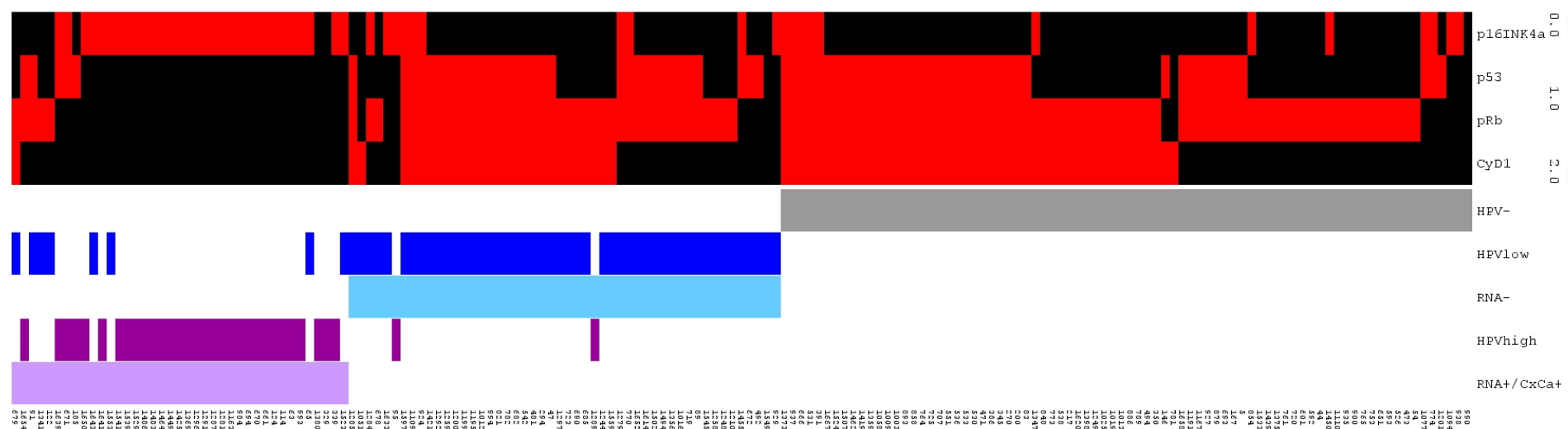


Abb. 4-19 Clusteranalyse (heat-map) zwischen den Expressionsleveln der zellulären Proteine p16^{INK4a}, p53, pRb und Cyclin D1 (CyD1) und dem HPV-Status der Tumoren. In diese Analyse wurden nur Tumoren eingeschlossen, die für alle vier Proteine auswertbare IHC-Ergebnisse hatten (n=169); HPV-negative OPSCC (HPV⁻, grau) n=80; Tumoren mit niedriger Viruslast (HPV_{low}, blau) n=56; HPV16 DNA-positive Tumoren ohne E6*I/E6*I Expression oder ohne RNA-Muster (RNA⁻, hellblau) n=50; Tumoren mit hoher Viruslast (HPV_{high}, violett) n=33; HPV16 DNA-positive Tumoren mit RNA-Muster n=39 (RNA⁺/CxCa⁺, hellviolett). Die Farbskala der Expressionslevel entspricht den Gesamtscores; 1, niedrige Expressionslevel (Score 0+1, schwarz); 2, hohe Expressionslevel (Score 2, rot). Ziffern in der untersten Reihe repräsentieren die Patienten-ID, die für diese Analyse eingeschlossen wurden.

4.2.2.2 Assoziationen zwischen zellulären Proteinmarkern und HPV16 RNA-Status der Tumoren

Aufgrund der Ergebnisse aus Tabelle 4-6 wurde angenommen, dass es sich bei dem Expressionsprofil p16^{INK4a}-niedrig, pRb-normal, Cyclin D1- und p53-hoch um ein für HPV⁻ Tumoren typisches Expressionsmuster handelt. Da die Tumoren der HPV⁻ Gruppe (n=93) für die folgende Analyse die Kontrollgruppe darstellten, wurden die Expressionslevel dieses Musters als Referenzkategorien herangezogen, um Assoziationen zwischen den RNA⁺/CxCa⁺ (n=55) oder den RNA⁻ (n=40) mit den zellulären Proteinmarkern bestimmen zu können. Als Maß für die Assoziationen zwischen den Expressionsniveaus der Proteinmarker und dem HPV RNA-Status wurden *Odds Ratios* (OR) mittels logistischer Regressionsanalyse berechnet (siehe 3.9.4, Methodenteil).

Die Gruppen HPV⁻ und RNA⁻ waren hinsichtlich der klinischen und demographischen Variablen recht homogen (Tabelle 4-7). Die Patienten beider Gruppen unterschieden sich weder in ihrem Alter, Geschlecht, klinischem Stadium noch in ihrem Rauchverhalten. Lediglich der Alkoholkonsum war signifikant mit der RNA⁻ Gruppe assoziiert (OR=3,75; 95%KI 1,1-12,2).

Tab. 4-7 Assoziationen zwischen den klinischen/demographischen Variablen und den zellulären Proteinmarkern im Vergleich der RNA⁻ mit den HPV⁻ OPSCC.

Klinische und demographische Variablen				OR	95%KI	p
Alter				1,01	0,9-1,1	0,8
Geschlecht (weiblich vs. männlich)				1,78	0,8-4,1	0,2
Klinisches Stadium (IV vs. I-III)				0,82	0,4-1,7	0,6
Tabakstatus (Raucher vs. Ex-Raucher)				0,45	0,1-1,4	0,2
Alkoholkonsum						
Abstinenz vs. Ex-Alkoholiker				1,86	0,2-13,6	0,5
Konsument vs. Ex-Alkoholiker				3,75	1,1-12,2	0,03
Proteinmarker		HPV ⁻¹ n	RNA ⁻² n	OR	95%KI	p
p16^{INK4a}	niedrig	73	41	1,0		
	hoch	12	11	2,00	0,7-5,3	0,2
pRb	normal	81	45	1,0		
	niedrig	10	10	1,5	0,6-4,2	0,4
Cyclin D1	hoch	48	28	1,0		
	niedrig	37	24	1,4	0,7-3,1	0,4
p53	hoch	44	33	1,0		
	Expressionsverlust	28	11	0,5	0,2-1,3	0,2
	normal	18	9	0,9	0,3-2,6	0,9

¹HPV DNA-negative Tumoren (Kontrollgruppe); ²HPV16 DNA-positive Tumoren ohne E6*I/E6*I Expression oder ohne RNA-Muster; OR, *Odds Ratio* adjustiert nach Alter, Geschlecht, klinischem Stadium, Alkohol- und Tabakkonsum; signifikante OR sind fett dargestellt; KI, Konfidenzintervall.

Ebenso war die Expression der zellulären Proteinmarker zwischen HPV⁻ und RNA⁻ Tumoren nicht unterschiedlich; keiner der Marker war signifikant mit der RNA⁻ Gruppe assoziiert (Tabelle 4-7). Für die folgenden Analysen wurden daher beide Gruppen HPV⁻ und RNA⁻ zur Referenzgruppe ohne HPV-Beteiligung (non-HPV; n=148) zusammengefasst.

Beim Vergleich der RNA⁺/CxCa⁺ OPSCC (n=40) mit den Tumoren ohne aktive HPV16-Beteiligung (non-HPV, repräsentiert durch die HPV⁻ plus RNA⁻ Tumoren, n=148), zeigten sich sinnvolle und signifikante Unterschiede: sowohl ein fortgeschrittenes klinisches Stadium (OR=3,3; 95%KI 1,1-9,8), als auch der Nichtraucher-Status (OR=9,4; 95%KI 1,7-51,5) waren mit der RNA⁺/CxCa⁺ Gruppe assoziiert (Tabelle 4-8).

Tab. 4-8 Assoziationen zwischen den klinischen/demographischen Variablen und zellulären Proteinmarkern im Vergleich zwischen den RNA⁺/CxCa⁺ und den OPSCC ohne aktive HPV16-Beteiligung.

Klinische und demographische Variablen				OR	95%KI	p
Alter				1,04	0,9-1,1	0,1
Geschlecht (weiblich vs. männlich)				1,77	0,7-4,4	0,2
Klinisches Stadium (IV vs. I-III)				3,3	1,1-9,8	0,03
Tabakstatus						
Nicht- vs. Ex-Raucher				9,4	1,7-51,5	0,009
Raucher vs. Ex-Raucher				0,73	0,2-3,0	0,7
Alkoholkonsum						
Abstinenz vs. Ex-Alkoholiker				2,4	0,2-29,8	0,5
Konsument vs. Ex-Alkoholiker				3,5	0,4-28,7	0,2

Proteinmarker		non-HPV ¹ n	RNA ⁺ / CxCa ⁺ ² n	OR	95%KI	p
p16^{INK4a}	niedrig	114	8	1,0		
	hoch	23	31	14,0	5,0-39,6	<0,01
pRb	normal	126	6	1,0		
	niedrig	20	34	27,3	8,7-25,6	<0,01
Cyclin D1	hoch	76	2	1,0		
	niedrig	61	38	17,5	3,8-80,3	<0,01
p53	hoch	77	6	1,0		
	Expressionsverlust	39	5	1,9	0,5-7,2	0,4
	normal	27	29	10,6	3,4-33,3	<0,01

¹HPV DNA-negative Tumoren plus HPV16 DNA-positive OPSCC ohne RNA-Muster (Kontrollen); ²HPV16 DNA-positive Tumoren mit RNA-Muster (Fälle); OR, Odds Ratio adjustiert nach Alter, Geschlecht, klinischem Stadium, Alkohol- und Tabakkonsum; signifikante OR sind fett dargestellt; KI, Konfidenzintervall.

Hinsichtlich der zellulären Proteinmarker waren die RNA⁺/CxCa⁺ Tumoren im Vergleich zu den Tumoren ohne aktive HPV16-Beteiligung signifikant mit hohen p16^{INK4a}, niedrigen pRb, Cyclin D1 und p53 Expressionsleveln assoziiert (Tabelle 4-8). Der stärkste Marker für RNA⁺/CxCa⁺ OPSCC waren nicht wie erwartet hohe p16^{INK4a}, sondern niedrige pRb-Expressionslevel (OR=27,3; 95%KI 8,7-25,6), während eine normale p53 Expression den schwächsten Marker für eine aktive HPV-Beteiligung (OR=10,6; 95%KI 3,4-33,3) darstellte.

4.2.2.3 Überlebensanalysen in Abhängigkeit zu den zellulären Proteinmarkern

Um die prognostische Relevanz der untersuchten zellulären Marker zu bestimmen, wurden die Tumoren nach den Expressionsleveln (den Scores) der jeweiligen Proteinmarker stratifiziert und das OS und PFS für die einzelnen Gruppen uni- und multivariat berechnet.

Nach deskriptiver Analyse ergab sich ein signifikanter Vorteil für das OS der Patienten mit hoher p16^{INK4a}-Expression oder niedriger pRb-Expression in ihren Tumoren (jeweils 122 Monate gegenüber 34 bzw. 31 Monaten, Tabelle 4-9). Auch für die Patienten mit einer niedrigen Cyclin D1-Expression war die mediane Überlebenszeit deutlich höher (102 Monate gegenüber 32 Monaten). Zwar verfehlte dieser Marker knapp das Signifikanzniveau (p=0,06, Tabelle 4-9), es zeigte sich aber sein Potential in einer Markerkombination relevant zu werden.

Für den Marker p53 konnte ebenfalls kein signifikanter Überlebensvorteil festgestellt werden. Auch hier war jedoch ein für Markerkombinationen möglicherweise relevanter Trend erkennbar: Patienten mit einer normalen p53-Expression in den Tumoren (niedriges Expressionslevel) hatten eine mediane Überlebenszeit von 87 Monaten, während Patienten mit einer Überexpression ein medianes OS von 44 und Patienten mit p53-Verlust gar nur ein medianes OS von 32 Monaten aufwiesen. Zudem gab es in der Patientengruppe mit einer normalen p53-Expression nur 41% OPSCC-bedingte Todesfälle, während in den Gruppen ‚hoch‘ bzw. ‚keine Expression‘ mehr als die Hälfte der Patienten an ihrem Tumor verstorben waren (Tabelle 4-9).

Tab. 4-9 Gesamtüberleben der OPSCC Patienten nach zellulärer Proteinexpression.

Proteinmarker	n (total)	mediane Überlebenszeit (Monate)	Events		p*
			n	%	
p16^{INK4a}					
niedrig	122	34	71	58	0,03
hoch	54	122	18	33	
pRb					
normal	132	31	77	58	0,01
niedrig	54	122	19	35	
Cyclin D1					
hoch	78	32	47	60	0,06
niedrig	99	102	42	42	
p53					
hoch	83	44	44	53	0,5
Expressionsverlust	44	32	27	61	
normal	56	87	23	41	

*Log-Rank-Test

Analog zum OS war eine hohe p16^{INK4a}- bzw. eine niedrige pRb-Expression ebenso signifikant mit einem besseren PFS assoziiert (Abb. 4-20A+B und 4-21A+B). Zusätzlich resultierte hier für eine niedrige Cyclin D1-Expression ein signifikant besseres PFS. Im Vergleich zum OS waren die medianen Überlebenszeiten des PFS für jeden Marker insgesamt kürzer und es wurden für das PFS häufiger Ereignisse registriert als für das OS (Tabelle 4-10).

Tab. 4-10 Progressionsfreies Überleben der OPSCC Patienten nach zellulärer Proteinexpression.

Proteinmarker	n (total)	mediane Überlebenszeit (Monate)	Events		p*
			n	%	
p16^{INK4a}					
niedrig	122	20	81	66	0,02
hoch	54	67	21	39	
pRb					
normal	132	17	86	65	0,004
niedrig	54	55	22	41	
CyD1					
hoch	78	17	54	69	0,01
niedrig	99	51	48	48	
p53					
hoch	83	18	50	60	0,3
Expressionsverlust	44	21	31	70	
normal	56	40	25	45	

*Log-Rank-Test

Die multivariaten Überlebensanalysen zeigten ein anderes Bild: Nur die niedrige Expression von pRb war ein signifikanter Vorteil für die Patienten, sowohl für das Gesamtüberleben als auch für das progressionsfreie Überleben. Die betroffenen Patienten hatten ein um 47% bzw. um 43% geringeres Risiko an ihrem Tumor zu versterben (HR=0,53; 95%KI 0,3-0,9) oder eine Tumorprogression zu erleiden (HR=0,57; 95%KI 0,3-0,9) als Patienten mit normaler pRb-Expression in ihrem Tumor (Tabelle 4-11).

Tab. 4-11 Überlebensanalysen mittels multivariater Cox-Regressions Modelle.

Proteinmarker		OS			PFS		
		HR	95%KI	p	HR	95%KI	p
p16 ^{INK4a}	niedrig	1,0			1,0		
	hoch	0,74	0,4-1,4	0,3	0,89	0,5-1,5	0,7
pRb	normal	1,0			1,0		
	niedrig	0,53	0,3-0,9	0,04	0,57	0,3-0,9	0,04
Cyclin D1	hoch	1,0			1,0		
	niedrig	0,83	0,5-1,3	0,4	0,76	0,5-1,2	0,2
p53	hoch	1,0			1,0		
	Expressionsverlust	1,37	0,8-2,3	0,2	1,29	0,8-2,0	0,3
	normal	1,31	0,7-2,4	0,4	1,23	0,7-2,1	0,5

OS, Gesamtüberleben (*overall survival*); PFS, progressionsfreies Überleben (*progression-free survival*); HR, *Hazard Ratio* adjustiert nach Alter, Geschlecht, klinisches Stadium und Alkohol- und Tabakkonsum; signifikante HR sind fett dargestellt; KI, Konfidenzintervall.

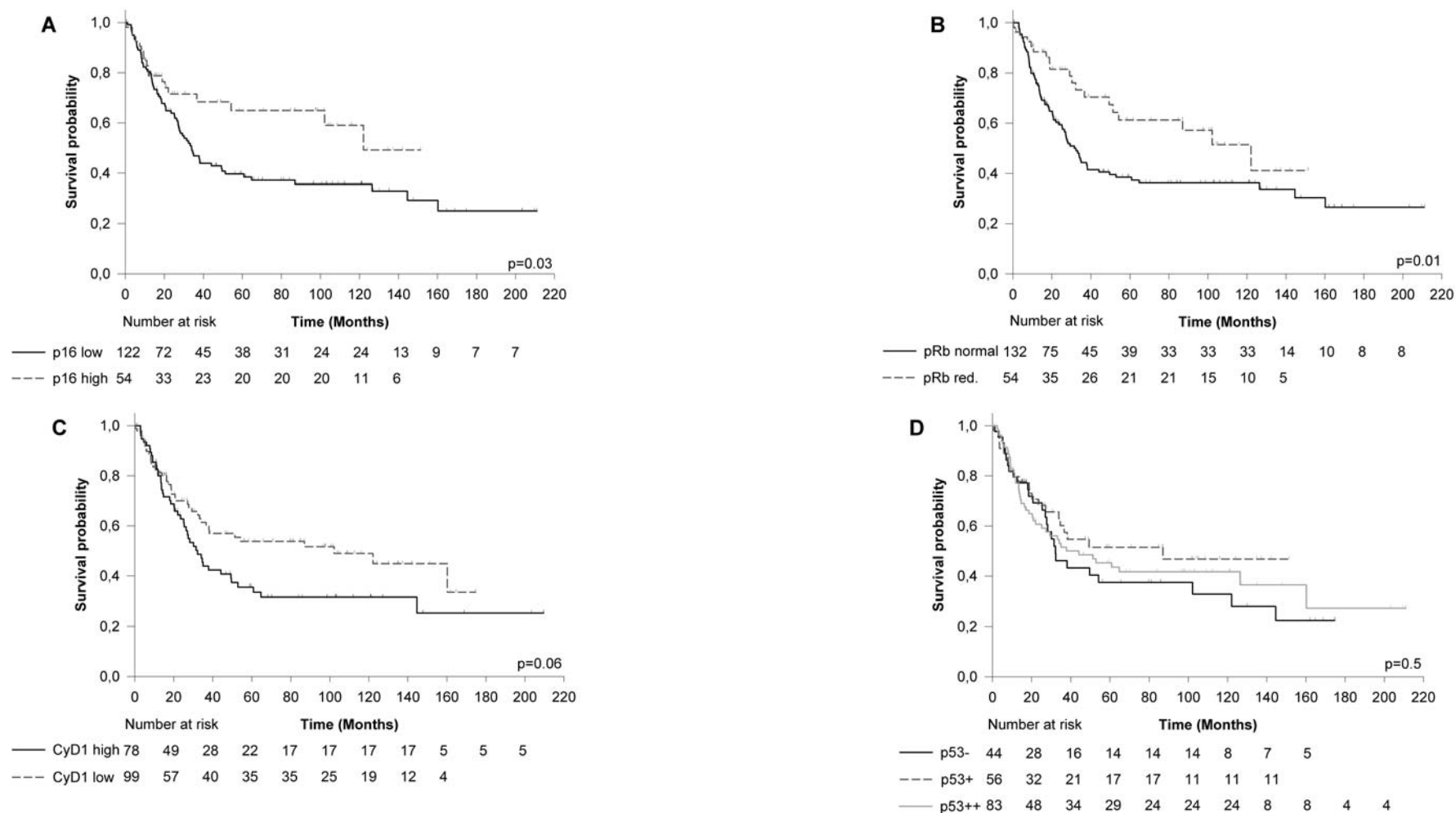


Abb. 4-20 Gesamtüberleben der OPSCC Patienten stratifiziert nach zellulärer Proteinexpression. Die Patienten wurden nach den Expressionsleveln der potentiellen zellulären Proteinmarker p16^{INK4a} (A), pRb (B), Cyclin D1 (C) und p53 (D) stratifiziert. Unterschiede zwischen den Überlebenskurven wurden durch den Log-Rank-Test bestimmt.

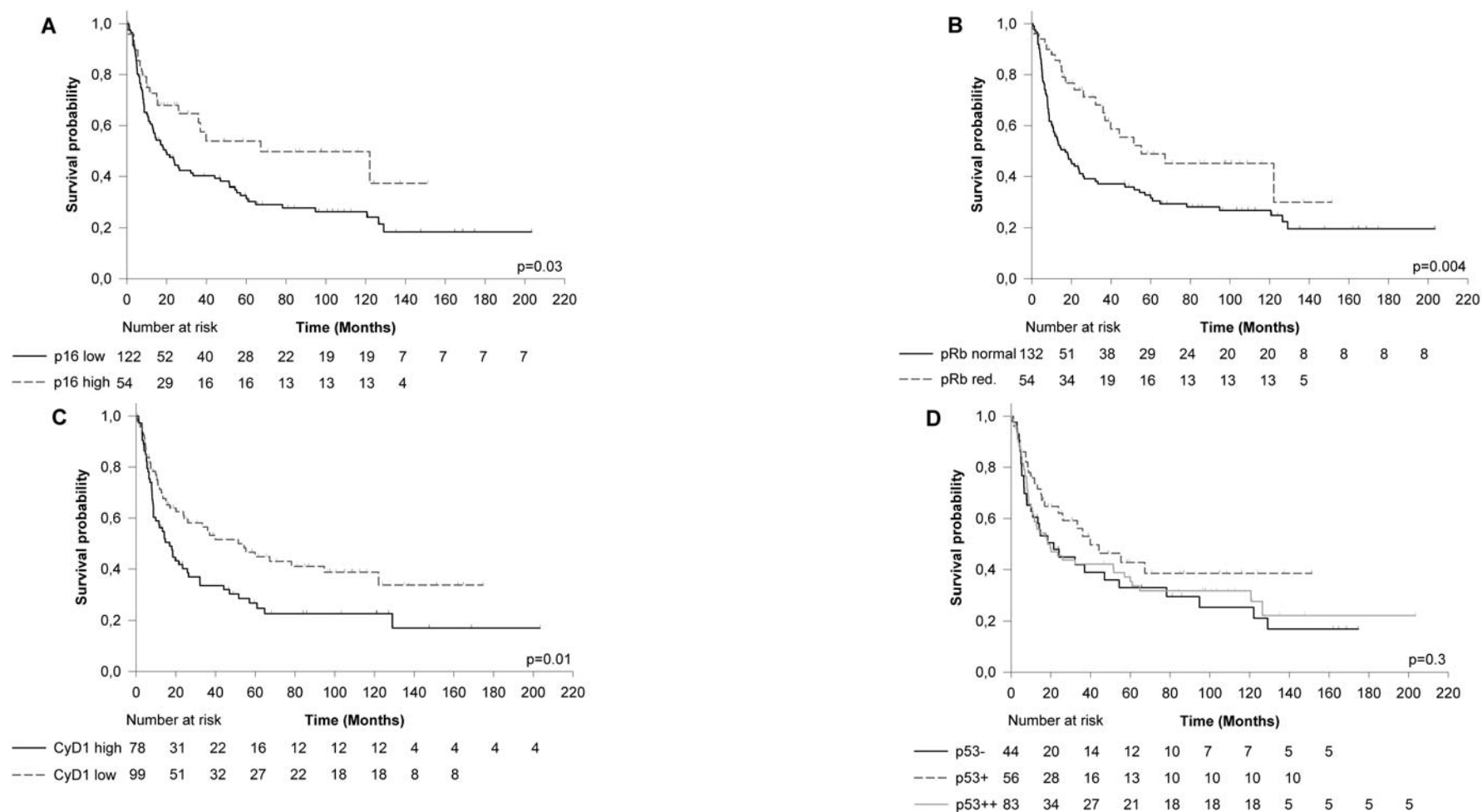


Abb. 4-21 Progressionsfreies Überleben der OPSCC Patienten stratifiziert nach zellulärer Proteinexpression. Die Patienten wurden nach den Expressionsleveln der potentiellen zellulären Proteinmarker p16^{INK4a} (A), pRb (B), Cyclin D1 (C) und p53 (D) stratifiziert. Unterschiede zwischen den Überlebenskurven wurden durch den Log-Rank-Test bestimmt.

4.3 Markerkombinationen zur Identifizierung von OPSCC mit aktiver HPV16-Beteiligung

In diesem Teil der Arbeit wurden die untersuchten viralen und zellulären Marker miteinander kombiniert, um zu prüfen, ob bestimmte Kombinationen die OPSCC mit einer aktiven HPV16-Beteiligung am Tumorgeschehen noch effizienter identifizieren können.

4.3.1 Viruslast und virale RNA-Muster

Zunächst wurden die beiden viralen Marker Viruslast und RNA-Muster miteinander kombiniert, da beide Marker eine sehr gute prognostische Relevanz besaßen (siehe 4.1.4, Ergebnisteil) und da zwischen den beiden entsprechenden Patientengruppen eine sehr hohe Kongruenz bestand; 31/33 (94%) der HPV_{high} Tumoren waren gleichzeitig RNA⁺/CxCa⁺. Jedoch wurden 9 RNA⁺/CxCa⁺ OPSCC durch den Marker HPV_{high} nicht detektiert (Abbildung 4-22). Da aber davon auszugehen war, dass die viralen RNA-Muster einen kritischen Parameter für die HPV16-induzierte Transformation darstellen, wurden die HPV_{high} Tumoren mit den RNA⁺/CxCa⁺ Fällen der HPV_{low} Gruppe zur HPV_{transf}⁺ Gruppe (n=42) kombiniert. Die HPV_{low} Tumoren ohne die viralen RNA-Muster repräsentierten dagegen die HPV_{transf}⁻ Gruppe (n=54; Abbildung 4-22).

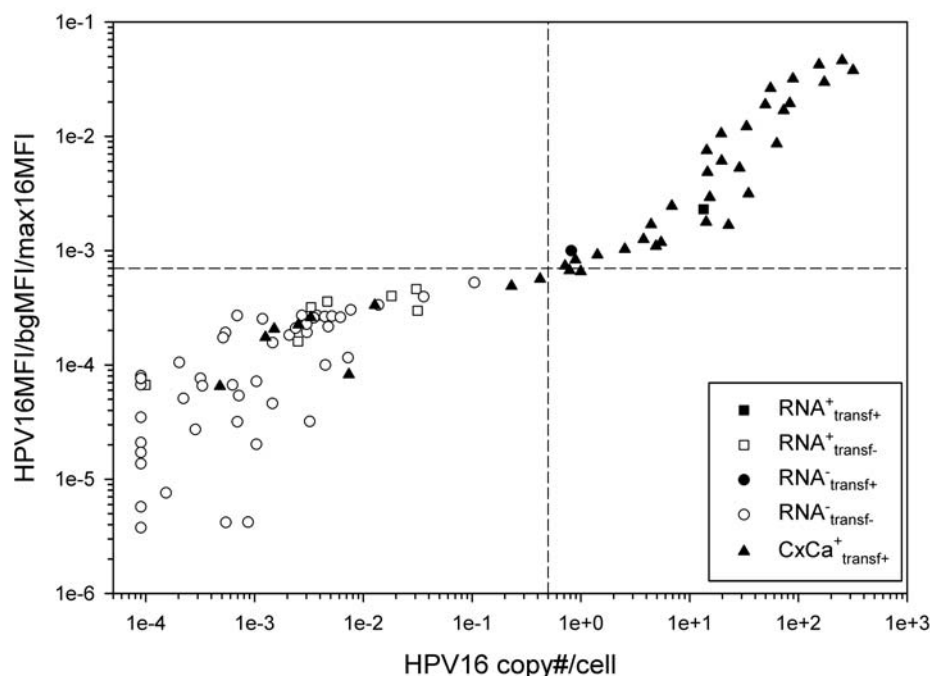


Abb. 4-22 Korrelation zwischen der HPV16 qPCR (copy#/cell, x-Achse) und BSGP5+/6+-PCR/MPG-Analyse. Jedes Symbol repräsentiert einen Tumor; Tumoren der HPV_{transf}⁻ Gruppe sind durch weiße, Tumoren der HPV_{transf}⁺ Gruppe sind durch schwarze Symbole dargestellt. Tumoren waren entweder positiv für die viralen RNA-Muster (CxCa⁺ transf⁺, schwarze Dreiecke) oder positiv für die viralen E6*-Transkripte allein (RNA⁺, Quadrate). E6*-negative Tumoren (RNA⁻) sind durch Kreise dargestellt. Gestrichelte Linien repräsentieren die Cut-offs der jeweiligen Analyse zwischen einer niedrigen und einer hohen Viruslast.

Die Relevanz der Markerkombination aus Viruslast und viralen RNA-Mustern wurde entsprechend der einzelnen Virusmarker erneut über das Überleben der Patienten definiert und mit dem der Einzelmarker verglichen. Nach der Kaplan Meier Analyse (Abbildung 4-23) und ebenfalls nach multivariater Überlebensanalyse (Tabelle 4-12) ergab die Kombination beider Marker einen ähnlichen signifikanten Überlebensvorteil für die Patienten wie er für die Marker jeweils allein berechnet wurde. Patienten der HPV_{transf}⁺ Gruppe hatten sowohl ein ähnlich geringes Risiko am Oropharynx tumor zu versterben (HR=0,33; 95%KI 0,1-0,7), als auch ein ähnliches Risiko eine Tumorprogression zu erleiden (HR=0,50; 95%KI 0,3-0,9), wie Patienten der RNA⁺/CxCa⁺ bzw. der HPV_{high} Gruppe (Tabelle 4-12). Patienten mit Tumoren ohne biologisch aktives HPV16, die hier durch die HPV_{transf}⁻ Gruppe repräsentiert wurden, hatten wiederum ein ähnliches Risiko am Tumor zu versterben bzw. eine Tumorprogression zu erleiden, wie Patienten mit HPV⁻ Tumoren (Tabelle 4-12).

Tab. 4-12 Cox Regressions-Analyse für die Markerkombination Viruslast-RNA⁺/CxCa⁺ im Vergleich zu den Einzelmarkern.

Im Vergleich zu den Einzelmarkern:							
Parameter	n	OS			PFS		
		HR	95% KI	p	HR	95% KI	p
HPV Marker							
HPV ⁻ (Referenz)	99	1,00			1,00		
HPV _{low}	64	0,82	0,5-1,3		0,88	0,6-1,3	
HPV _{high}	33	0,33	0,1-0,8	0,03	0,46	0,2-0,9	0,09
HPV ⁻ (Referenz)	99	1,00			1,00		
RNA ⁻ plus RNA ⁺ /CxCa ⁻	56	0,95	0,6-1,5		0,93	0,6-1,4	
RNA ⁺ /CxCa ⁺	40	0,31	0,1-0,7	0,01	0,51	0,3-0,9	0,1
HPV Markerkombination							
HPV ⁻ (Referenz)	99	1,00			1,00		
HPV _{transf} ⁻	54	0,96	0,6-1,5		0,95	0,6-1,4	
HPV _{transf} ⁺	42	0,33	0,1-0,7	0,01	0,50	0,3-0,9	0,08

OS, Gesamtüberleben (*overall survival*); PFS, progressionsfreies Überleben (*progression-free survival*); HR, *Hazard Ratio*; KI, Konfidenzintervall. Modelle wurden adjustiert nach Alter, Geschlecht, klinischem Stadium, Therapie und Alkohol-/Tabakkonsum. Statistisch signifikante Werte sind fett dargestellt. Die p-Werte wurden für jedes Gesamtmodell berechnet.

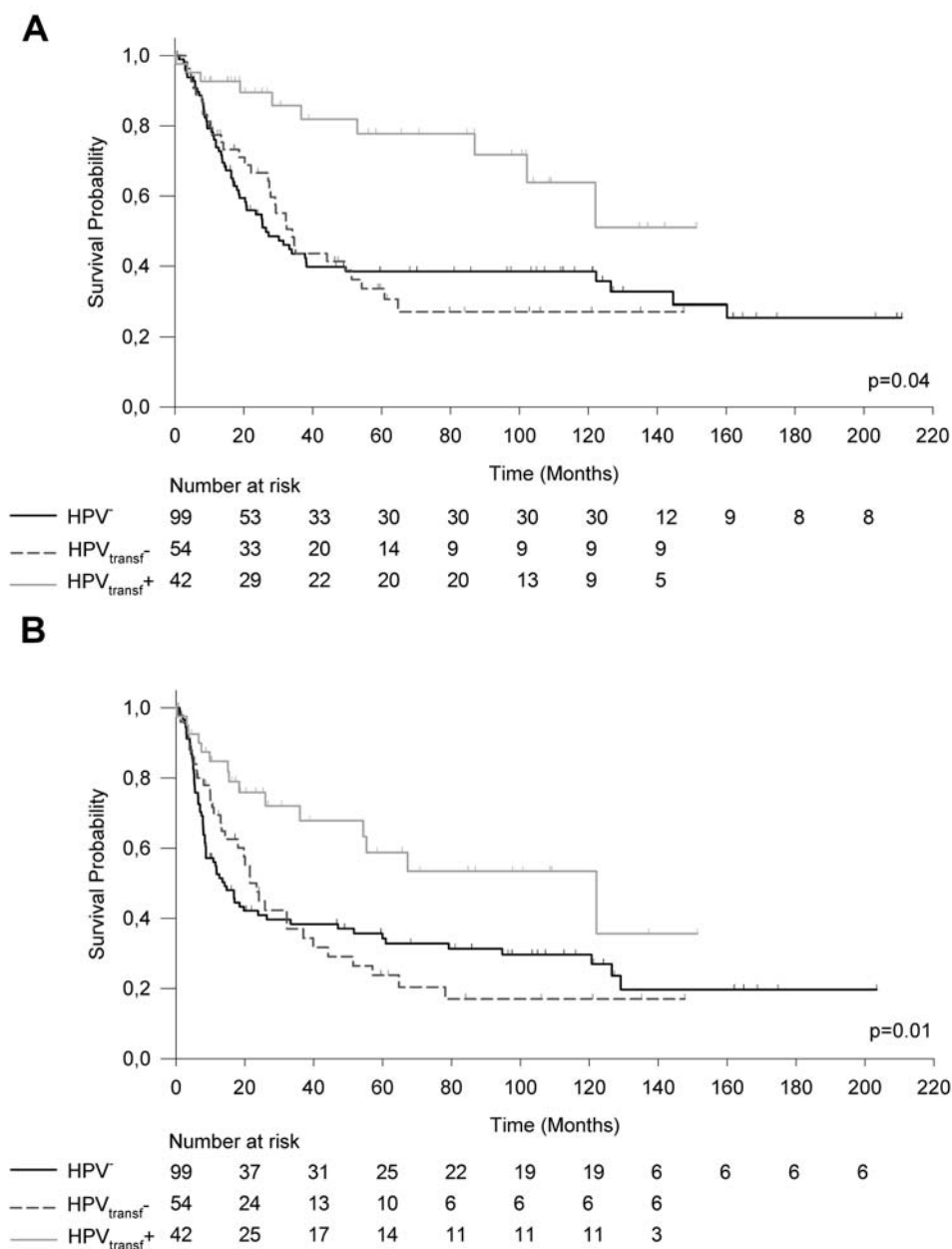


Abb. 4-23 Gesamtüberleben (A) und progressionsfreies Überleben (B) der Patienten stratifiziert nach der HPV Markerkombination Viruslast und RNA-Muster (HPV_{transf}). HPV⁻, HPV DNA-negative OPSCC; HPV_{transf}⁻, OPSCC mit niedriger Viruslast und ohne virale RNA-Muster; HPV_{transf}⁺, OPSCC mit hoher Viruslast und/oder viralen RNA-Mustern.

Zusätzlich zu den berechneten *Hazard Ratios* wurde die Vorhersagegüte (*prediction accuracy*) der einzelnen Marker und der Markerkombination für die prognostische Relevanz jedes Markers bestimmt. Die Vorhersagegüte wurde mittels Log-likelihood-Test berechnet. Mit diesem Test wurde das Cox-Modell der klinischen/demographischen Variablen mit den Modellen, in denen die Marker jeweils inkludiert waren, verglichen. Dadurch wurde ermittelt, ob ein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Modellen vorlag.

Verglichen mit dem klinischen Grund-Modell (Tabelle 4-3, Kapitel 4.1.4.1.2, Ergebnissteil), war die Vorhersagegüte des Gesamtüberlebens immer dann verbessert, wenn die einzelnen viralen Marker in das klinische Cox-Modell mit aufgenommen wurden, d. h. die Vorhersagegüte wurde durch die viralen Marker verbessert. Die stärkste Verbesserung resultierte aus der Kombination von Viruslast und RNA-Mustern (Tabelle 4-13). Für das PFS konnte dagegen keine Verbesserung der Vorhersagegüte für die einzelnen Marker DNA und RNA beobachtet werden; jedoch waren erneut für die Marker Viruslast, RNA-Muster und deren Kombination eine Verbesserung gegeben (Tabelle 4-13).

Tab. 4-13 Log-likelihood Test zur Bestimmung der prognostischen Relevanz der viralen Marker und Markerkombination für das Gesamt- und progressionsfreie Überleben.

zusätzlicher Parameter	OS		PFS	
	Chi-Quadrat	p	Chi-Quadrat	p
DNA	4,3	0,04	2,5	0,1
Viruslast	9,4	0,009	8,3	0,02
RNA	7,2	0,03	4,3	0,1
RNA-Muster	11,3	0,004	6,6	0,04
Kombination*	11,4	0,003	7,4	0,02

OS, Gesamtüberleben (*overall survival*); PFS, progressionsfreies Überleben (*progression-free survival*);

*Kombination bezieht sich auf Viruslast und RNA-Muster; signifikante Werte sind fett dargestellt.

4.3.2 Zelluläre Proteinmarkerkombinationen

Jeder einzelne zelluläre Proteinmarker pRb, p16^{INK4a}, Cyclin D1 und p53 war mit den RNA⁺/CxCa⁺ Tumoren dieser Arbeit, d. h. Tumoren mit aktivem HPV16, assoziiert (Tabelle 4-8, Kapitel 4.2.2.2, Ergebnissteil), jedoch wies keiner der Marker allein ein vergleichbares prognostisches Potential wie z. B. die viralen Marker Viruslast oder RNA-Muster auf. Daher wurde in diesem Teil untersucht, ob die Kombination zwischen den zellulären Markern zu einer ähnlichen diagnostischen und prognostischen Relevanz führt wie sie für die vorgenannten viralen Marker gefunden wurde.

Da mit nur einer Ausnahme (p16^{INK4a}/p53) alle Proteinmarker signifikant miteinander korrelierten (Tabelle 4-14), wurden Assoziationen zwischen allen möglichen Proteinkombinationen (n=10) und den RNA⁺/CxCa⁺ Tumoren berechnet. Zwischen den Proteinen p16^{INK4a} und pRb, sowie p16^{INK4a} und Cyclin D1 bestand eine inverse Beziehung (Tabelle 4-14), d. h. bei einem hohen Expressionslevel von p16^{INK4a} wurde häufig ein niedriges Expressionslevel von pRb oder Cyclin D1 nachgewiesen; zwischen den Proteinen pRb und p53, pRb und Cyclin D1 oder p53 und Cyclin D1 resultierte dagegen eine positive

Korrelation, d. h. bei einem niedrigen Proteinexpressionslevel des einen Proteins, lag für das andere Protein meist ebenso eine niedrige Expression vor.

Tab. 4-14 Korrelationen zwischen den einzelnen Proteinmarkern.

Proteinmarker	pRb		p53		Cyclin D1	
	r_s	p	r_s	p	r_s	p
p16 ^{INK4a}	-0,65	<0,0001	-0,08	0,3	-0,36	<0,0001
pRb			0,17	0,03	0,47	<0,0001
p53					0,26	<0,0001

r_s , Spearman's Rangkorrelationskoeffizient; signifikante Korrelationskoeffizienten sind fett dargestellt.

Die Kombination von zwei Proteinmarkern ergab für eine hohe p16^{INK4a}-Expression bei gleichzeitig niedriger pRb-Expression die stärkste Assoziation mit der RNA⁺/CxCa⁺ Gruppe (OR=59,1; 95%KI 15,3-228,8; p<0,01; Tabelle 4-15). Alle RNA⁺/CxCa⁺ Tumoren mit einer hohen p16^{INK4a}-Expression hatten auch niedrige Expressionslevel für pRb (31/40, 78%), während nur 8/148 (5%) der Tumoren ohne aktive HPV16-Beteiligung diese spezifische Markerkombination aufwiesen (vgl. Tabelle 4-8, Kapitel 4.2.2.2, Ergebnisteil).

Nach der Kombination von drei Proteinmarkern wurde die stärkste Assoziation mit den RNA⁺/CxCa⁺ Tumoren für das Proteinexpressionsmuster p16^{INK4a}-hoch/pRb-niedrig/p53-normal (OR=85,5; 95%KI 17,4-420,5; p<0,01) gefunden. Das Proteinexpressionsmuster nach Kombination aller vier Proteinmarker (p16^{INK4a}-hoch/pRb-niedrig/p53-normal/CyD1-normal) zeigte ebenso eine sehr starke Assoziation mit den RNA⁺/CxCa⁺ Tumoren (OR=82,5; 95%CI 16,8-404,0; p<0,01; Tabelle 4-15).

Als Maß der Vorhersagekraft der Proteinmarkerkombinationen die RNA⁺/CxCa⁺ Tumoren zu identifizieren, wurden außerdem Sensitivität (Se), Spezifität (Sp), positiver und negativer Vorhersagewert (PPV, NPV) herangezogen. Obwohl die Proteinexpressionsmuster der Dreifachkombination p16^{INK4a}-hoch/pRb-normal/p53-normal und der Vierfachkombination die stärksten Assoziationen mit den RNA⁺/CxCa⁺ Tumoren aufwiesen, war die Vorhersagekraft dieser Markerkombinationen nicht eindeutig besser als z. B. die der Zweierkombination p16^{INK4a}-hoch/pRb-niedrig (Sensitivität 74% vs. 79%, Tabelle 4-15), die ebenso eine starke Assoziation mit den RNA⁺/CxCa⁺ Tumoren zeigte.

Analog zu den viralen Markern wurde die Relevanz der Proteinmarkerkombinationen über das Überleben der Patienten ermittelt. Für die Markerkombinationen mit den stärksten Assoziationen wurden entsprechende *Hazard Ratios* in multivariaten Cox Regressions-Modellen berechnet. Zum Vergleich wurde die HR des Proteinmarkers pRb, das als einziges

Protein einen signifikanten Überlebensvorteil für die Patienten zeigte (Tabelle 4-11, Kapitel 4.2.2.3, Ergebnisteil), sowie die des besten viralen Markers (RNA⁺/CxCa⁺, Kapitel 4.1.4.1.2, Ergebnisteil) in die Tabelle 4-16 eingefügt.

Tab. 4-15 Assoziationen zwischen den Proteinmarkerkombinationen und den RNA⁺/CxCa⁺ OPSCC.

Protein-Markerkombination	non-HPV ¹ n=148	RNA ⁺ /CxCa ⁺ ² n=40		Se ³	Sp ³	PPV ³	NPV ³
	n	n	OR (95%KI)				
p16/pRb							
andere	129	8	1,0				
hoch/nied	8	31	59,1 (15,3-228,8)	79	94	79	94
p16/p53							
andere	128	12	1,0				
hoch/nor	6	27	42,3 (11,3-158,7)	69	95	82	91
p16/CyD1							
andere	119	8	1,0				
hoch/nied	13	31	26,3 (8,4-82,9)	79	90	70	94
pRb/CyD1							
andere	123	6	1,0				
nied/nied	14	34	48,0 (13,3-173,0)	85	90	71	95
pRb/p53							
andere	135	11	1,0				
nied/nor	7	29	37,7 (10,8-131,6)	72	95	81	92
p53/CyD1							
andere	99	7	1,0				
nor/nied	36	33	12,0 (4,1-35,2)	82	73	48	93
p16/pRb/p53							
andere	129	10	1,0				
hoch/nied/nor	5	29	85,5 (17,4-420,5)	74	96	85	93
p16/pRb/CyD1							
andere	124	8	1,0				
hoch/nied/nied	8	31	56,6 (14,6-218,6)	79	94	79	94
pRb/p53/CyD1							
andere	127	9	1,0				
nied/nor/nied	8	31	66,8 (15,4-289,5)	77	94	79	93
p16/pRb/p53/CyD1							
andere	125	10	1,0				
hoch/nied/nor/nied	5	29	82,5 (16,8-404,0)	74	96	85	93

¹HPV DNA-negative plus HPV16 DNA-positive Tumoren ohne RNA-Muster (Kontrollgruppe), ²HPV16 DNA-positive Tumoren mit RNA-Mustern (Fälle), ³Sensitivität (Se; %), Spezifität (Sp; %), positiver Vorhersagewert (PPV; %) und negativer Vorhersagewert (NPV; %) wurden als Maß für die korrekte Klassifikation der RNA⁺/CxCa⁺ OPSCC für die Markerkombinationen berechnet; OR, *Odds Ratio* adjustiert nach Alter, Geschlecht, klinischem Stadium, Alkohol- und Tabakkonsum; signifikante OR sind fett dargestellt; KI, Konfidenzintervall; nor, normal; nied, niedrig

Tab. 4-16 Cox Regressions-Analyse für die Proteinmarkerkombinationen im Vergleich zu pRb und virale RNA-Muster.

Protein/Marker/ Markerkombination	Expressionsmuster/ Gruppe	HR	95%KI	p
pRb	nor	1,0		
	nied	0,53	(0,3-0,9)	0,04
p16 ^{INK4a} /pRb	andere	1,0		
	hoch/nied	0,34	(0,1-0,8)	0,01
p16 ^{INK4a} /pRb/p53	andere	1,0		
	hoch/nied/nor	0,31	(0,1-0,9)	0,04
p16 ^{INK4a} /pRb/p53/CyD1	andere	1,0		
	hoch/nied/nor/nied	0,39	(0,2-0,9)	0,03
HPV16 RNA	HPV ⁻	1,0		
	RNA ⁻	0,95	(0,6-1,5)	
	RNA ⁺ /CxCa ⁺	0,31	(0,1-0,7)	0,01

HR, *Hazard Ratio* adjustiert nach Alter, klinisches Stadium, Alkohol- und Tabakkonsum, Therapiestatus und Geschlecht; signifikante HR sind fett dargestellt; KI, Konfidenzintervall; nor, normal; nied, niedrig.

Patienten stratifiziert nach der Doppelproteinmarker-Kombination p16^{INK4a}-hoch/pRb-niedrig hatten im Vergleich zu Patienten ohne dieses Proteinexpressionsmuster ein um 66% reduziertes Risiko am Oropharynx tumor zu versterben (HR=0,34; 95%CI 0,15-0,79; p=0,01). Ein ähnlich signifikanter Überlebensvorteil wurde für Patienten mit dem Expressionsmuster p16^{INK4a}-hoch/pRb-niedrig/p53-normal oder p16^{INK4a}-hoch/pRb-niedrig/p53-normal/CyclinD1-niedrig ermittelt (Tabelle 4-16). Diese Überlebensvorteile lagen im Bereich der viralen RNA-Muster und waren deutlich besser als das Ergebnis für den Proteinmarker pRb allein.

4.3.3 Virus DNA und zelluläre Proteinmarker

Ein für die Routinediagnostik einfacher und praktikabler Algorithmus für die Identifizierung von Formalin-fixierten und in Paraffin-eingebetten (FFPE) Kopf-Hals Tumoren mit aktiver HPV16-Beteiligung wurde von Smeets *et al.* (114) vorgeschlagen (siehe 1.4, Einleitungsteil). Demnach hatten die Tumoren eine aktive Virusbeteiligung, wenn sie zunächst in p16^{INK4a}-Immunhistochemie positiv waren und anschließend zusätzlich in einer GP5+/6+-PCR HPV-DNA nachweisbar war. Jedoch war diese Studie auf nur 12 Karzinome beschränkt.

Da in dieser Arbeit der HPV DNA-Status bestimmt, sowie auch die Immunhistochemie für p16^{INK4a} durchgeführt wurde, wurde dieser Algorithmus an der Kohorte von 199 Oropharynx-tumoren geprüft, jedoch mit einem Unterschied: Der DNA-Status in dieser Studie wurde an Frischgewebe-Biopsien bestimmt, während der der Smeets-Arbeit an FFPE-Material untersucht wurde.

Außerdem zeigte sich in dieser Arbeit, dass pRb als IHC-Marker allein und vielmehr noch in Kombination mit p16^{INK4a} ein gutes prognostisches und diagnostisches Potential aufwies, die Tumoren mit aktiver HPV-Beteiligung zu identifizieren (siehe 4.3.2, Ergebnisteil). Daher wurde zusätzlich pRb, sowie die Kombination p16^{INK4a}/pRb mit den Ergebnissen der HPV DNA-Analyse zusammengefügt und mit den Ergebnissen der einzelnen IHC-Marker verglichen.

Tab. 4-17 Assoziationen zwischen den Kombinationen von Proteinmarkern und HPV16 DNA und den RNA⁺/CxCa⁺ OPSCC im Vergleich zu den Proteinmarkern allein.

Marker/ Markerkombination		non-HPV ¹ n=148	RNA ⁺ /CxCa ⁺ ² n=40					
		n	n	OR (95%KI)	Se ³	Sp ³	PPV ³	NPV ³
p16								
	niedrig	114	8	1,0				
	hoch	23	31	14,0 (5,0-39,6)	79	83	57	94
p16/16DNA								
	andere	126	8	1,0				
	hoch/16+	11	31	36,4 (11,1-118,9)	79	92	74	94
pRb								
	normal	126	6	1,0				
	niedrig	20	34	27,3 (8,7-25,6)	85	86	77	96
pRb/16DNA								
	andere	136	6	1,0				
	niedrig/16+	10	34	75,7 (19,3-296,1)	85	93	77	96
p16/pRb								
	andere	129	8	1,0				
	hoch/nied	8	31	59,1 (15,3-228,8)	79	94	79	94
p16/pRb/16DNA								
	andere	133	8	1,0				
	hoch/nied/16+	4	31	109,1 (23,9-499,2)	79	97	89	94

¹HPV DNA-negative plus HPV16 DNA-positive Tumoren ohne RNA-Muster (Kontrollgruppe), ²HPV16 DNA-positive Tumoren mit RNA-Muster (Fälle), ³Sensitivität (Se; %), Spezifität (Sp; %), positiver Vorhersagewert (PPV; %) und negativer Vorhersagewert (NPV; %) wurden als Maß für die korrekte Klassifikation der RNA⁺/CxCa⁺ OPSCC für die Markerkombinationen berechnet; 16+, Tumoren positiv für HPV16-DNA nach GP5+/6+-PCR/MPG; OR, *Odds Ratio* adjustiert nach Alter, Geschlecht, klinischem Stadium, Alkohol- und Tabakkonsum; signifikante OR sind fett dargestellt; KI, Konfidenzintervall; nor, normal; nied, niedrig

Wenn der HPV16-Status mit den zellulären Proteinmarkern kombiniert wurde, konnte für alle Marker und Markerkombinationen eine stärkere Assoziation zu den Tumoren mit viralen RNA-Mustern (RNA⁺/CxCa⁺) erreicht werden (Tabelle 4-17). Während die Sensitivität für alle Kombinationen unverändert blieb, wurde durch die Hinzunahme des viralen DNA-Staus vor allem die Spezifität verbessert, d. h. die Anzahl der falsch-positiven Fälle wurde für jede Kombination um die Hälfte reduziert (Tabelle 4-17). Die stärkste Assoziation mit der RNA⁺/CxCa⁺ Gruppe wurde für die Tumoren berechnet, die hohe p16^{INK4a}-, gleichzeitig

niedrige pRb-Expressionslevel zeigten und zusätzlich in der BSGP5+/6+-PCR/MPG positiv waren.

Für die Proteinmarker p16^{INK4a} und pRb allein wurde durch die Berücksichtigung des HPV DNA-Status ebenso das prognostische Potential verbessert. Trotzdem war für die Kombination von hohen p16^{INK4a}-Expressionsleveln mit HPV16 DNA-Positivität, also der Algorithmus angelehnt an Smeets *et al.* (114) kein signifikanter Überlebensvorteil für die Patienten ersichtlich (Tabelle 4-18). Für die Kombination von pRb mit HPV16 DNA-Positivität wurde dagegen eine *Hazard Ratio* erreicht, die vergleichbar war zu der des besten viralen Markers, den viralen RNA-Mustern. Die Berücksichtigung des viralen DNA-Status bei der Proteinmarkerkombination p16^{INK4a}/pRb ergab keine weitere Verbesserung für die prognostische Relevanz (Tabelle 4-18).

Tab. 4-18 Cox Regressions-Analyse für die Kombinationen der Proteinmarker mit HPV16 DNA-Status im Vergleich zu den Proteinmarkern und zu den viralen RNA-Mustern.

Protein/Marker/ Markerkombination	Expressionsmuster/ Gruppe	HR	95%KI	p
p16	niedrig	1,0		
	hoch	0,74	(0,4-1,4)	0,3
p16/16DNA	andere	1,0		
	hoch/16+	0,66	(0,3-1,3)	0,2
pRb	normal	1,0		
	niedrig	0,53	(0,3-0,9)	0,04
pRb/16DNA	andere	1,0		
	niedrig/16+	0,37	(0,2-0,7)	0,01
p16 ^{INK4a} /pRb	andere	1,0		
	hoch/niedrig	0,34	(0,1-0,8)	0,01
p16 ^{INK4a} /pRb/16DNA	andere	1,0		
	hoch/niedrig/16+	0,36	(0,2-0,8)	0,02
HPV16 RNA	HPV ⁻	1,0		
	RNA ⁻	0,95	(0,6-1,5)	
	RNA ⁺ /CxCa ⁺	0,31	(0,1-0,7)	0,01

16+, Tumoren positiv für HPV16-DNA nach GP5+/6+-PCR/MPG; HR, *Hazard Ratio* adjustiert nach Alter, klinisches Stadium, Alkohol- und Tabakkonsum, Therapiestatus und Geschlecht; signifikante HR sind fett dargestellt; KI, Konfidenzintervall.

5 DISKUSSION

Einige wenige der über 100 Typen des Humanen Papillomvirus, die so genannten ‚high-risk‘ Typen, können Plattenepithelkarzinome und Adenokarzinome im Genitalbereich, insbesondere im Gebärmutterhals, induzieren (3). Die DNA des häufigsten ‚high-risk‘ Typen, HPV16, wurde in den letzten Jahren auch bei einem Teil (zwischen 20 und 80%) der Plattenepithelkarzinome des Kopf-Hals Bereiches (*head and neck squamous cell carcinoma*, HNSCC), vor allem in der Oropharynxregion, gefunden (60, 68). Eine kausale Beteiligung von HPV16 am Tumorgeschehen gilt jedoch nur für eine Untergruppe dieser Tumoren mit aktiver Expression der Onkogene E6 und E7 als gesichert (43, 86).

Um eine kausale Assoziation von HPV mit den Oropharynxtumoren festzustellen, wurde in den bisherigen Studien als Marker häufig die Virus-DNA herangezogen, analysiert mittels PCR oder *In-Situ* Hybridisierung (ISH). Es zeigte sich jedoch vor allem in Studien aus Westeuropa, dass der Nachweis von Virus-DNA allein nicht ausreichend ist, um eine aktive Beteiligung von HPV16 am Tumorgeschehen nachzuweisen. Nur die Analyse nach der Expression der viralen Onkoproteine E6 und/oder E7 gilt als klinisch und biologisch relevant (43, 65, 86, 87, 97, 139). Jedoch ist die Analyse der viralen RNA Transkripte bislang auf frisch-gefrorene Gewebebiopsien beschränkt. An Formalin-fixierten und in Paraffin-eingebetteten (FFPE) Biopsien – nur diese stehen für die Routinediagnostik und auch für die meisten Forschungslabore zur Verfügung – ist die Analyse heute noch nicht zuverlässig.

In dieser Arbeit wurde der Versuch einer umfassenden und vergleichenden Analyse aller potentiellen viralen und zellulären Marker für die Identifizierung von OPSCC mit aktiver HPV16-Beteiligung unternommen, unter Einschluss sowohl von frisch-gefrorenem Biopsiematerial als auch von archiviertem FFPE-Material, das auf einem Gewebechip vereinigt wurde. Als Endpunkt wurden das Gesamt- und das progressionsfreie Überleben der Patienten herangezogen, da in mehreren Studien gezeigt wurde, dass Patienten mit HPV-positiven Tumoren ein besseres Überleben zeigen als Patienten mit HPV-negativen Tumoren (66, 68, 71, 81-83).

Im ersten Teil der Arbeit wurden frisch-gefrorene Gewebebiopsien von 199 Oropharynxkarzinomen auf eine aktive HPV16-Beteiligung untersucht. Potentielle Marker waren HPV DNA, Viruslast, onkogene RNA (E6*II/E6*I) und virale RNA-Muster. Im zweiten Teil wurde an archiviertem Material (FFPE-Material) derselben Tumoren zum einen die HPV16 FISH durchgeführt, um ihre Wertigkeit mit der Viruslast und der RNA Expressionsanalyse zu vergleichen; zum anderen wurden zelluläre Proteine immunhistochemisch an den Tumoren untersucht, um zu testen, wie gut die Expressionslevel dieser Proteine mit den viralen

Markern korrelieren. Sollten sie gut korrelieren, wären sie den viralen Markern vorzuziehen, da sie schneller und kostengünstiger zu erfassen sind und als Surrogat- bzw. Biomarker in die Routinediagnostik eingebettet werden könnten. Als entscheidend stellte sich hierbei heraus, dass nicht nur p16^{INK4a} untersucht wurde, sondern auch pRb als Zielprotein des viralen Onkoproteins E7, sowie Cyclin D1, das direkt von pRb reguliert wird, und p53 als Zielprotein des E6-Onkoproteins.

5.1 Analyse an frisch-gefrorenem Biopsiematerial: Virale Marker zur Identifizierung von OPSCC mit aktiver HPV16-Beteiligung

Die hier gefundene Prävalenz (49%) der HPV-positiven Oropharynx Tumoren (HPV⁺ Gruppe), die durch die BSGP5+/6+-PCR/MPG-Analyse nachgewiesen wurde, bestätigt bereits publizierte Studien (1, 60, 68, 70, 73, 140, 141). Auch die ausgeprägte Dominanz von HPV16 mit 97% (siehe 4.1.1.1, Ergebnisteil) war mit anderen Studien gut vergleichbar; beispielsweise wiesen in einer Studie von Gillison *et al.* (68) unter den HPV-positiven Tumoren 90% den HPV-Typ 16 auf. Die Dominanz von HPV16 ist bei den HNSCC somit wesentlich ausgeprägter als beim Zervixkarzinomen (CxCa), bei dem der Anteil von HPV16 nur bei etwa 60% liegt (5).

Die 199 Tumoren, die in der vorliegenden Arbeit untersucht wurden, stammten ausschließlich aus dem Oropharynx. Damit wurde ausgeschlossen, dass eventuell zu beobachtende Heterogenitäten im biologischen und klinischen Verhalten der Tumoren auf andere Kopf-Hals Regionen zurückzuführen waren, bei denen zwar auch zu einem gewissen Anteil (bis zu 25%) HPV DNA entdeckt werden kann (141), eine karzinogene Rolle des Virus aber zweifelhaft ist.

Nach HPV DNA-Status allein wiesen die HPV⁺ Tumoren und die HPV-negativen Tumoren (HPV⁻ Gruppe) nur geringfügige Unterschiede in ihren Tumoreigenschaften auf; die HPV⁺ Tumoren stammten hauptsächlich aus den Tonsillen des Oropharynx und es waren mehr ehemalige Alkoholiker in der HPV⁻ als in der HPV⁺ Gruppe vertreten (Tabelle 4-1, Kapitel 4.1.3, Ergebnisteil). Dies steht im Einklang mit anderen Studien, in denen v. a. die Tonsillen als die Region des Oropharynx gelten, die am häufigsten mit HPV-assoziiert sind (1, 142, 143). Ebenso wurde in anderen Studien belegt, dass ein starker Alkoholkonsum eher mit HPV-negativen HNSCC assoziiert ist (41, 69, 71, 75). Eine Beschränkung der Analysen auf Karzinome des ‚Waldeyer’schen Tonsillenrings‘ hätte in dieser Arbeit 23% (9/40) der Tumoren mit aktiver HPV-Beteiligung (Tabelle 4-1, Kapitel 4.1.3, Ergebnisteil) verpasst. Daher ist der Einschluss aller Lokalisationen des Oropharynx in dieser Arbeit gerechtfertigt.

Für das Überleben wurden allerdings weder im univariaten Modell (Kaplan Meier Analysen, Abbildung 4-11 und 4-12, Kapitel 4.1.4, Ergebnisteil) noch im multivariaten Cox Regressionsmodell statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Patienten mit HPV⁺ und HPV⁻ Tumoren berechnet (Tabellen 4-3 (OS) und 4-5 (PFS); Kapitel 4.1.4, Ergebnisteil). Die Stratifizierung nach der Expression der onkogenen RNA (viralen E6*II/E6*I Transkripte, RNA⁺ Gruppe) war dagegen wesentlich besser geeignet, um die Patienten mit einem besseren Überleben zu definieren (Tabelle 4-3, Kapitel 4.1.4, Ergebnisteil). Eine kürzlich aus Frankreich publizierte Studie kam zum gleichen Ergebnis (86).

Zusätzlich wurde in der vorliegenden Studie die Viruslast in den Tumoren bestimmt und es wurde zum ersten Mal untersucht, ob die HPV16 DNA-positiven Oropharynx Tumoren spezifische virale RNA-Muster exprimieren, wie sie für das HPV16-positive Zervixkarzinom (CxCa) und hochgradige Läsionen der Zervix kürzlich beschrieben wurden (39). Es zeigte sich, dass die Marker Viruslast und virale RNA-Muster die Patienten mit einem besseren Überleben noch genauer definierten als der Marker onkogene RNA (Tabelle 4-3, Kapitel 4.1.4, Ergebnisteil). Darüber hinaus wiesen die viralen RNA-Muster im Vergleich zur Viruslast eine höhere Sensitivität auf; durch sie wurden 31/33 HPV_{high} Tumoren sowie zusätzlich 9 HPV_{low} Tumoren als RNA⁺/CxCa⁺ klassifiziert (Abbildung 4-9, Kapitel 4.1.2.2, Ergebnisteil).

Zwischen den Patienten mit Tumoren positiv für RNA Muster-1 und Muster-2 waren bezüglich des Überlebens keine signifikanten Unterschiede zu erkennen (Ergebnisse nicht gezeigt). Da die Gruppen aber verhältnismäßig klein waren (Muster-1, n=15; Muster-2, n=25), sollten diese Befunde an größeren Studien weiterverfolgt werden, um eine zuverlässige Aussage darüber treffen zu können. Nur 37% der RNA⁺/CxCa⁺ Tumoren zeigten das Muster-1, d. h. eine hohe Kopienzahl von E6*II/E6*I bei gleichzeitig niedriger oder abwesender Kopienzahl des E1⁺E4 Transkripts. Obwohl ein Nachweis bislang noch fehlt, kann dieses Muster höchstwahrscheinlich die Integration des Virusgenoms ins Wirtszellgenom anzeigen (40, 144). Der Prozentsatz von 37% der OPSCC mit HPV16-Integration aus dieser Studie ist niedriger als der Prozentsatz von ca. 55% wie er für das Zervixkarzinom beschrieben wurde (145), er ist aber vergleichbar mit dem, der in anderen OPSCC Studien publiziert wurde (41-43). Wenn auch spekulativ, scheint die HPV-Integration für die Karzinogenese im Kopf-Hals Bereich daher kein notwendiges Ereignis zu sein, sondern im Falle von episomal vorliegenden HPV-Genomen auf anderen Mechanismen, wie z. B. der Hochregulation des E1C-Transkriptes, zu beruhen (40).

Die Analyse der viralen RNA-Muster ist jedoch sehr komplex und nicht in jedem Labor durchführbar. Ein vereinfachter, aber dennoch präziser Algorithmus die Tumoren mit aktiver

HPV16-Beteiligung zu identifizieren, wurde durch die Kombination der Marker Viruslast mit den viralen RNA-Mustern erreicht. Die Tumoren der HPV_{high} Gruppe wurden mit den RNA⁺/CxCa⁺ Tumoren der HPV_{low} Gruppe zur Gruppe HPV_{transf}⁺ zusammengeschlossen, während HPV_{low} Tumoren ohne virale RNA-Muster die HPV_{transf}⁻ Gruppe repräsentierten (Abbildung 5-1). Die Analyse der viralen RNA-Muster war somit nur noch auf die Tumoren mit einer niedrigen Viruslast beschränkt, ohne dabei an Sensitivität zu verlieren. Hinsichtlich des Überlebens zeigte die Markerkombination HPV_{transf} ein ebenso gutes Potential wie der beste Einzelmarker, die viralen RNA-Muster (Tabellen 4-12 und 4-13, Kapitel 4.3.1, Ergebnisteil). Die Vorteile der Kombination liegen dabei in Zeitersparnis und Kostensenkung, indem zunächst alle Tumoren mittels der sehr einfachen, schnellen und kostengünstigen BSGP5+/6+-PCR/MPG, gefolgt von der qPCR für die HPV16-positiven Fälle analysiert werden und anschließend nur diejenigen Tumoren mit einer niedrigen Viruslast die kompliziertere, zeitaufwendigere und kostenintensivere Analyse der viralen RNA-Muster durchlaufen.

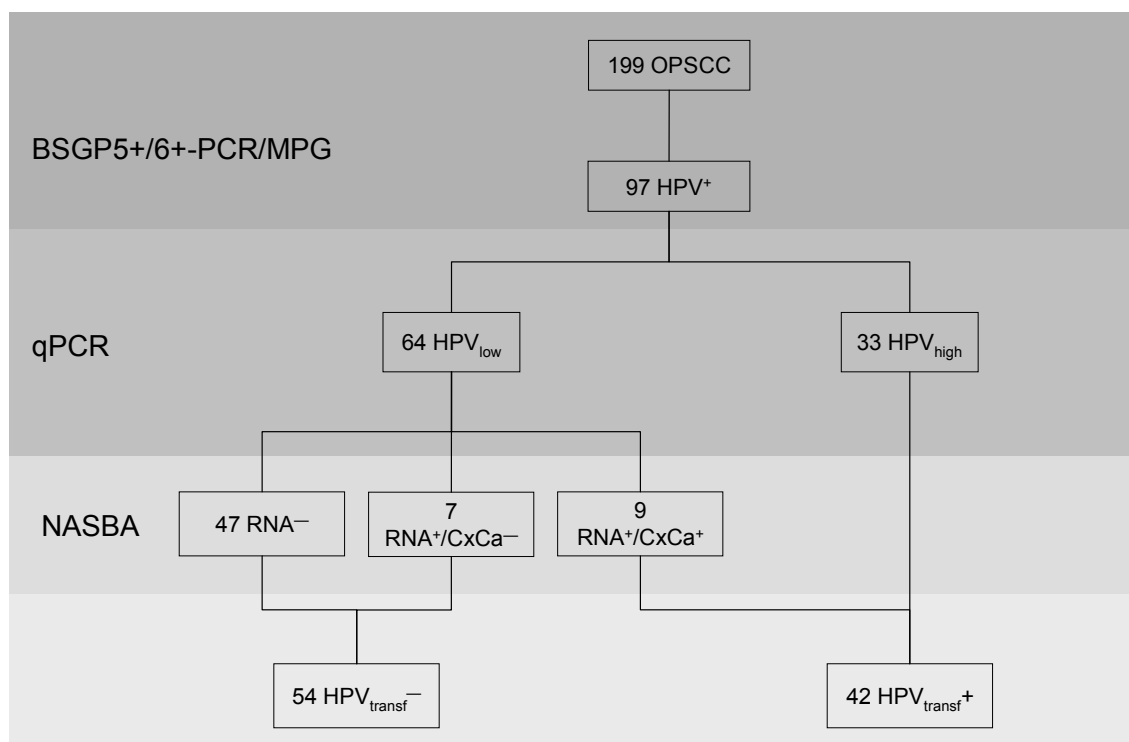


Abb. 5-1 Übersicht der OPSCC stratifiziert nach der Markerkombination Viruslast und RNA-Muster. HPV⁺, HPV16 DNA-positive OPSCC; HPV_{low}/HPV_{high}, OPSCC mit niedriger/hocher Viruslast, bestimmt durch qPCR; RNA⁻, HPV16 DNA-positive und E6*I/E6*I RNA-negative OPSCC; RNA⁺/CxCa⁻, HPV16 DNA- und E6*I/E6*I RNA-positive OPSCC, jedoch ohne virale RNA-Muster; RNA⁺/CxCa⁺, HPV16 DNA- und E6*I/E6*I RNA-positive OPSCC mit viralen RNA-Mustern; HPV_{transf}⁻, OPSCC mit niedriger Viruslast und ohne RNA-Muster; HPV_{transf}⁺, OPSCC mit hoher Viruslast und/oder RNA-Mustern. NASBA, *nucleic acid sequence based amplification*.

Die Analysen der viralen Marker zur Identifizierung von OPSCC mit aktiver HPV-Beteiligung, vor allem die Überlebensanalysen der Patienten, wiesen jedoch auch einige Schwächen auf, insbesondere da es trotz der Studienkohorte von 199 Tumoren statistisch nicht möglich war, zwischen den RNA⁺ Tumoren mit und ohne virale RNA-Muster zu unterscheiden (RNA⁺/CxCa⁻ vs. RNA⁺/CxCa⁺). Es konnte für die RNA⁺/CxCa⁺ Tumoren gegenüber den RNA⁺/CxCa⁻ Tumoren keine verbesserte Vorhersagegüte (*prediction accuracy*) ermittelt werden, was auf die geringe Anzahl der RNA⁺/CxCa⁻ Tumoren (n=8) zurückzuführen ist. Da aber eine ähnliche *Hazard Ratio* für die acht RNA⁺/CxCa⁻ Tumoren berechnet wurde wie für die Tumoren ohne aktives HPV16 (RNA⁻ Gruppe), diese acht Tumoren auch in der Histologie, der Tumorsublokalisierung und den zellulären Proteinexpressionsmustern ähnlich zu den RNA⁻ Tumoren waren, konnte davon ausgegangen werden, dass sie sich wie Tumoren ohne aktives HPV16 verhalten und infolgedessen wurden sie in die RNA⁻ Gruppe mit aufgenommen.

Die Prävalenz von HPV16 DNA in den Oropharynxkarzinomen dieser Studie mit 49% und insbesondere die der viralen RNA-Muster mit 20%, die die Tumoren mit aktiver HPV-Beteiligung repräsentieren, ist vergleichbar mit der aus anderen westeuropäischen Studien (80, 86, 87, 112, 146). Sie ist aber deutlich geringer als diejenige, die in den wichtigsten skandinavischen und US-amerikanischen Studien publiziert wurde ((66, 75, 82, 85, 141, 147); Abbildung 5-2). In den US-amerikanischen und auch in den skandinavischen Studien wurde von einer DNA-Prävalenz zwischen 64% und 85% berichtet, die der westeuropäischen Studien liegt dagegen zwischen 13% und 54%. Allerdings stammten die niedrigen Prävalenzwerte von Studien, in denen alle Kopf-Hals Regionen eingeschlossen waren (Niederlande (80, 87) und Frankreich (86)). Dennoch ist der geographische Unterschied deutlich. In einem systematischen Review (141), in dem ca. 1000 OPSCC aus mehreren Studien und Ländern, einschließlich den USA, Skandinavien und Westeuropa, zusammengefasst wurden, lag die HPV DNA-Prävalenz bei 35%. Betrachtet man die HPV-Prävalenz beim OPSCC bezüglich der Expression der viralen Onkogene E6 und/oder E7, wird der Unterschied zwischen den USA und Skandinavien einerseits und Westeuropa andererseits sogar noch größer. Im Gegensatz zu der hier vorgestellten Studie und den anderen westeuropäischen Studien (80, 86, 87, 112), in denen weniger als 50% der HPV DNA-positiven Tumoren gleichzeitig positiv für die onkogenen Virustranskripte E6/E7 waren, wurde in den skandinavischen Studien beispielsweise E6/E7 RNA, was als Beleg für eine aktive Beteiligung von HPV16 angesehen werden kann, bei 85% bis 98% der HPV DNA-positiven OPSCC gefunden ((85, 147); Abbildung 5-2).

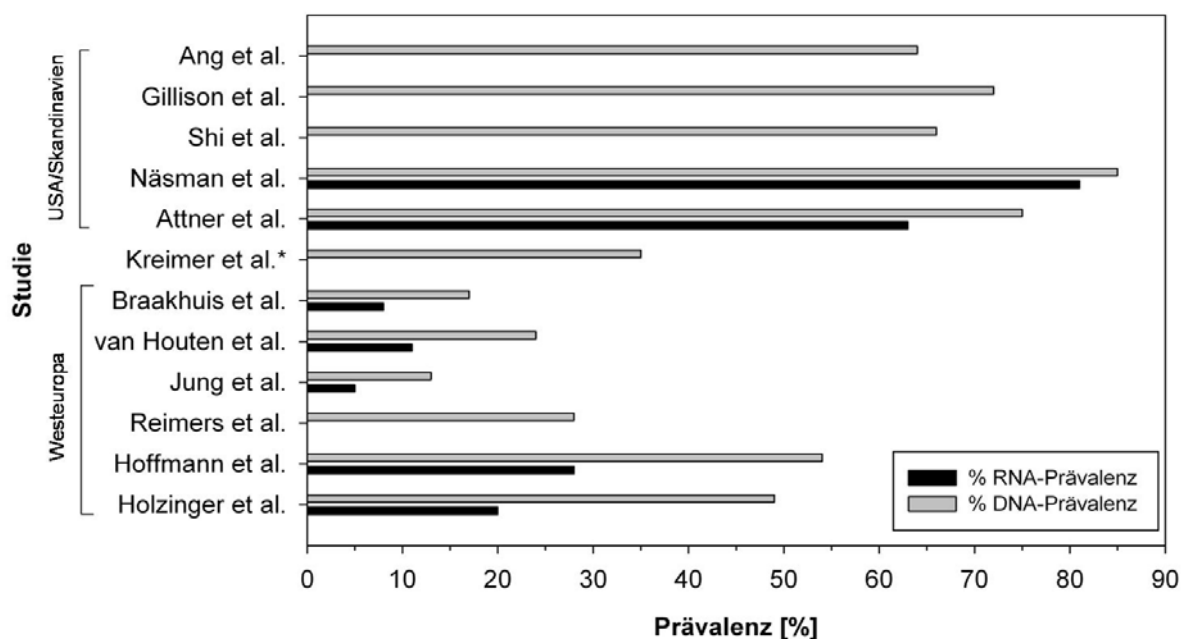


Abb. 5-2 HPV DNA-Prävalenz (grau, %) und RNA-Prävalenz (schwarz, %) in den wichtigsten skandinavischen/nordamerikanischen Studien im Vergleich zu den wichtigsten westeuropäischen Studien.

*systematischer Review (2005): Analyse von 969 Oropharynxkarzinomen aus 26 Ländern (60 Studien); die Studien Braakhuis, van Houten und Jung haben Kopf-Hals Tumoren aller Regionen eingeschlossen, die Prävalenzen sind demnach niedriger, alle anderen Studien haben ihre Analysen auf Tumoren des Oropharynx begrenzt.

Die Unterschiede in der Prävalenz von aktivem HPV16 unter den HPV-positiven Oropharynxkarzinomen der skandinavischen und der westeuropäischen Studien könnten mit unterschiedlichen Lebensstilen, insbesondere mit den Rauchgewohnheiten der Patienten in Zusammenhang stehen, denn der verringerte Tabakkonsum wurde mit einer sinkenden Inzidenz von HPV-negativen OPSCC gesehen (52). Gleichzeitig gilt eine hohe Anzahl von Sexualpartnern und von oral-genitalen Kontakten als Risikofaktor für HPV-positive OPSCC (131, 148). Da im Vergleich zu der westeuropäischen Bevölkerung die Prävalenz der Nichtraucher in den letzten Jahrzehnten viel stärker in der nordamerikanischen und skandinavischen Bevölkerung zugenommen hat (149), stieg daher gleichermaßen auch die Prävalenz der HPV-positiven OPSCC in diesen Ländern an (52, 76, 150). In der vorliegenden Arbeit zeigte sich ebenfalls eine Verdoppelung der HPV DNA-Prävalenz von 1990 bis 2008, die Prävalenz der RNA⁺/CxCa⁺ Tumoren (Tumoren mit aktivem HPV16) unter den HPV-positiven OPSCCs stieg über die Jahre dagegen kaum an (Abbildung 4-10; Kapitel 4.1.2.3, Ergebnisteil). Zwar fanden sich alle Nichtraucher der HPV⁺ Gruppe (n=15) in der vorliegenden Studie in der RNA⁺/CxCa⁺ Gruppe wieder, der Prozentsatz der Raucher unter allen OPSCC Patienten war aber mit 78% (Tabelle 4-1; Kapitel 4.1.3, Ergebnisteil) viel höher als derjenige einer kürzlich publizierten US-amerikanischen Studie von nur 19% (66). Es scheint daher möglich, dass der Status als Raucher unter den HPV⁺ Patienten ohne virale

RNA-Muster Einfluss auf molekular-pathogene Signalwege hat. Beispielsweise könnten trotz der Präsenz von HPV DNA Mutationen im TP53-Gen auftreten (43, 87, 97), die dann die E6/E7 Expression überflüssig machen. Möglicherweise wird sich die Anzahl der HPV⁺ OPSCC ohne aktive HPV16-Beteiligung auch in Westeuropa verringern, sobald sich die Prozentzahlen der Raucher in den westeuropäischen an die der skandinavischen/US-amerikanischen Kohorten angeglichen haben.

Zusammenfassend zeigte sich durch die Analysen der viralen Marker HPV DNA, Viruslast, onkogene RNA und virale RNA-Muster, dass durch die hochsensitiven HPV DNA- und RNA-Detektionstechnologien nicht nur Oropharynxkarzinome mit einer hohen Viruslast und den viralen RNA-Mustern detektiert werden, sondern dass auch eine gewisse Anzahl unter den Tumoren mit einer niedrigen Viruslast biologisch aktives HPV16 zeigen. Durch die Analyse der HPV DNA allein wären zu viele falsch-positive Fälle detektiert worden, dagegen wären durch die Analyse der Viruslast allein einige positive Fälle fälschlicherweise als negativ klassifiziert worden. Die Tumoren mit den viralen RNA-Mustern zeigten im Vergleich zu den Tumoren ohne aktive HPV-Beteiligung nicht nur ein deutlich unterschiedliches klinisches Erscheinungsbild, sondern die Patienten hatten vor allem ein besseres Gesamt- und auch progressionsfreies Überleben. Demzufolge repräsentieren diese Tumoren gegenüber den Kopf-Hals Tumoren ohne HPV-Beteiligung eine eigene Tumorentität.

Durch die Kombination aus Viruslast und viralen RNA-Mustern gelang zudem ein verbesserter und praktikabler Algorithmus, die OPSCC mit aktiver HPV-Beteiligung zu identifizieren. Solange frisch-gefrorene Gewebebiopsien und geschultes Fachpersonal vorhanden sind, ist dieser Algorithmus am besten geeignet, aus einer heterogenen Gruppe von OPSCC die tatsächlich HPV-assoziierten OPSCC zu identifizieren.

Da in einigen Studien gezeigt werden konnte, dass Patienten mit HPV-assoziierten Tumoren unabhängig von den Behandlungsmodalitäten ein besseres Überleben haben (66, 81, 90-93), könnte somit eine präzise Definition der Tumoren mit aktiver HPV-Beteiligung – wie sie hier vorgeschlagen wurde – bei der Therapiewahl helfen.

5.2 Analysen an Formalin-fixiertem und in Paraffin-eingebettetem Material auf dem Gewebechip

5.2.1 Fluoreszenz In-Situ Hybridisierung im Vergleich zur PCR und zur Viruslast

Im Gegensatz zur PCR gelingt mit der *In-Situ* Hybridisierung (ISH) oder der Fluoreszenz *In-Situ* Hybridisierung (FISH; der Nachweis bei der ISH beruht auf chromogenen Signalen, bei der FISH werden fluoreszierende Farbstoffe eingesetzt) durch den Einsatz von HPV-spezifischen DNA-Sonden der direkte Nachweis des Virus in den Zellkernen und damit im Kontext des vorliegenden Gewebes. Bei Kenntnis der Histologie kann man daher detektieren, ob die Signale Tumorzellen oder aber andere Zellen im Gewebe markieren. Darüber hinaus ist beschrieben worden, dass man anhand der Signale zwischen integrierten oder episomalen HPV-Genomen differenzieren kann. Bei diffusen und granulären Signalen sollen episomale Genome, bei punktierten Signalen in den Zellkernen dagegen integrierte HPV-Genome vorliegen (41, 114, 134-138). Es sind mittlerweile einige kommerziell erwerbliche ISH-Kits erhältlich, die zumindest bei der HPV-Analyse des Zervixkarzinoms alle eine ähnliche Sensitivität aufweisen (138) und manche auch multiple HPV-Infektionen detektieren können. Die Detektion multipler HPV-Infektionen spielt beim HNSCC jedoch eine untergeordnete Rolle, da die große Mehrheit der Tumoren nur für einen Typ, HPV16, positiv ist (1, 60, 61, 65, 68, 70, 73, 139-141). Die ISH wird zur Detektion von HPV DNA, meist als einziger Marker, vor allem in den US-amerikanischen Studien eingesetzt (68, 75, 81-83, 111, 113, 120, 131, 132). Allerdings zeigte sich, dass die Sensitivität der ISH gegenüber der klassischen HPV DNA-Analyse durch PCR geringer ist, denn in einer neueren Metaanalyse (151) wurden durch HPV PCR 39,9% und durch ISH nur 29,8% OPSCC als HPV-positiv dokumentiert.

Aufgrund der quantitativen Daten, die im ersten Teil dieser Arbeit an frisch-gefrorenem Biopsiematerial mittels hochsensitiver Multiplex-PCR, qPCR und den viralen RNA-Analysen erhoben werden konnten, bot sich nun im zweiten Teil an, an archiviertem FFPE-Material derselben OPSCC die FISH anzuwenden. Auf diese Weise konnte geklärt werden, ob die FISH als alternative HPV DNA-Detektionsmethode in Frage kommt und OPSCC mit aktiver HPV-Beteiligung identifizieren kann. Die Methodik ist im Labor *Cancer (cyto)Genetics* der Universität Maastricht seit vielen Jahren etabliert und wurde schon häufig in diversen Studien publiziert (41, 114, 135-137). Durch eine Signalverstärkung mit Tyramid konnte die Arbeitsgruppe in Maastricht die Sensitivität der FISH auf eine Nachweisgrenze von 1-2 HPV Genomkopien erhöhen; ohne die Signalverstärkung lag die Nachweisgrenze bei 10-20 HPV Kopien.

Die Ergebnisse waren jedoch enttäuschend. Lediglich in der Spezifität zeigte die FISH in dieser Arbeit gute Eigenschaften, denn nur 2% der nach PCR-Methodik HPV-negativen OPSCC wurden durch die FISH als HPV-positiv gewertet (Abbildung 4-14; Kapitel 4.2.1, Ergebnisteil). In der Sensitivität und insbesondere bei der prädiktiven Wertigkeit war die FISH gegenüber den am frisch-gefrorenen Material erhobenen Markern jedoch klar unterlegen. Zwischen HPV DNA, analysiert durch BSGP5+/6+-PCR/MPG, und FISH bestand eine Übereinstimmung für die HPV⁺ OPSCC von nur 38%. Bezüglich der Viruslast, die am frisch-gefrorenen Material hervorragend mit den RNA Ergebnissen korrelierte, bestand zwischen OPSCC mit einer hohen Viruslast und FISH eine Übereinstimmung von nur 77% (Abbildung 4-14; Kapitel 4.2.1, Ergebnisteil). Die konträr zum Modellsystem sehr ungenügende Sensitivität der FISH am Gewebechip war hauptsächlich auf Probleme mit teilweise sehr hohen und von Stanze zu Stanze unterschiedlichen Hintergrundsignalen zurückzuführen. Es war vielfach schwierig, zwischen echten Signalen und Hintergrundsignalen zu differenzieren; vermutlich wurden auch in den 2% der Fälle, die nur in der FISH positiv waren, die Hintergrundsignale als echte Signale gewertet. Andererseits wurden bei einigen HPV-positiven Tumorstansen die echten Signale möglicherweise durch Hintergrundsignale aufgrund von zu starker Gewebefixierung überlagert und deshalb fälschlicherweise als HPV-negativ eingestuft. Diese Probleme bei der FISH sind bekannt und wurden auch schon früher beschrieben (152).

Noch schlechter fiel der Vergleich zwischen den am frisch-gefrorenen Biopsiematerial erhobenen Daten und der FISH bezüglich des physikalischen Status der HPV DNA aus. Der größte Teil der FISH-positiven Tumoren (86%) zeigte die für integrierte HPV-Genome typischen punktierten und nur 14% die für episomale Genome typischen diffusen und granulären Signale (siehe 4.2.1, Ergebnisteil). Dies steht in klarem Widerspruch zu den Ergebnissen der viralen RNA-Muster, anhand derer nur 37% der Tumoren potentiell integrierte, aber 63% potentiell episomale HPV-Genome aufwiesen (siehe 4.1.2.2, Ergebnisteil). Auch in anderen OPSCC-Studien wurde berichtet, dass nur eine Minorität (zwischen 0% und 41%) der HPV-positiven Tumoren integrierte Genome zeigten (41-43).

Zusammenfassend war die FISH vor allem auf Grund der schlechten Sensitivität weder als Marker allein, noch in Kombination mit anderen Markern geeignet, die Tumoren mit aktiver HPV-Beteiligung zu identifizieren. Auch die Differenzierung zwischen Tumoren mit integrierten und episomalen HPV-Genomen gelang nicht. Für klinische Zwecke, d. h. zur Diagnostik und Prognose, eignet sich die Methodik trotz ihrer guten klinischen Anwendbarkeit (schnell durchführbar, spezifisch und kostengünstig) daher nicht.

5.2.2 Zelluläre Proteinmarker zur Identifizierung von OPSCC mit aktiver HPV16-Beteiligung

Da gut funktionierende Antikörper gegen die viralen Onkoproteine E6 und/oder E7 bislang nicht kommerziell erhältlich sind, ist die Expressionsanalyse der entsprechenden RNA und viel mehr noch der Analyse spezifischer HPV16 RNA-Muster – wie im ersten Teil der vorliegenden Arbeit gezeigt (siehe 4.1, Ergebnisteil) – momentan als so genannter Goldstandard anzusehen, um OPSCC mit aktiver HPV-Beteiligung und dementsprechend Patienten mit einem besseren Überleben zu identifizieren. Allerdings ist die Analyse der viralen mRNA-Transkripte bislang durch die Verfügbarkeit von frisch-gefrorenen Gewebebiopsien limitiert. Im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit (siehe 4.2, Ergebnisteil) wurde daher durch die systematische vergleichende Analyse von FFPE-Material derselben Tumoren untersucht, ob zelluläre Proteine als Surrogatmarker für eine aktive HPV-Beteiligung der Tumoren dienen können. Diese wären insbesondere dann von Nutzen, wenn ausschließlich FFPE-Tumorbiopsien zur Verfügung stehen.

Für die immunhistochemischen Analysen der Proteinmarker p16^{INK4a}, pRb, Cyclin D1 und p53 standen für 188/199 (94%) OPSCC die entsprechenden FFPE-Gewebe zur Verfügung. Die Färbungen der Proteine wurden mit zwei unterschiedlichen Detektionssystemen analysiert, um zwischen einer abwesenden oder einer normal-schwachen Expression unterscheiden zu können (siehe 3.8.1, Methodenteil). Schließlich gaben die Färbungen Aufschluss über die Proteinexpressionsmuster in den Tumorgruppen, stratifiziert nach den viralen RNA-Mustern. Um die hohe Anzahl der Tumoren möglichst effizient zu analysieren, wurde ein Gewebechip erstellt. Dabei war es wichtig, von einem Patienten mehrere Biopsiestanzen des Tumors auf den Gewebechips auszuwerten, um verlässliche Ergebnisse zu erhalten. Aufgrund der bei Kopf-Hals Tumoren häufig beobachteten intratumoralen Heterogenität in der Proteinexpression wären negative Färbungen bei Beurteilungen nur einer Biopsiestanze nicht sehr zuverlässig.

5.2.2.1 *p16^{INK4a} als Marker für Oropharynxkarzinome mit aktiver HPV-Beteiligung*

P16^{INK4a} wird in den Zellkernen von gesunden Schleimhautzellen auf niedrigem Niveau exprimiert. Die Visualisierung der niedrigen Proteinexpressionslevel erfolgte nach immunhistochemischer Färbung mit Signalverstärkung mittels Tyramid (TSA-IHC, siehe 3.8.1.2, Methodenteil). Auf diese Weise war es möglich zwischen einer normal-schwachen Expression und dem Verlust des Proteins in den Tumorzellen unterscheiden zu können. Die erhöhte p16^{INK4a}-Expression war dagegen leicht mit der Standard-IHC zu sehen.

Von 188 OPSCC, die auf dem Gewebechip aufgetragen wurden, waren 176 für die p16^{INK4a}-Färbung auswertbar. Dabei waren die Tumoren mit einer aktiven HPV-Beteiligung (RNA⁺/CxCa⁺ Gruppe) signifikant mit einem hohen Expressionslevel von p16^{INK4a} assoziiert, 80% (31/40) der RNA⁺/CxCa⁺ Gruppe zeigten eine hohe Expression des Proteins (Tabellen 4-6 und 4-8, Kapitel 4.2.2, Ergebnisteil). Die Assoziation zwischen p16^{INK4a} und HPV-positiven OPSCC wurde damit bestätigt, der Prozentsatz der Ausnahmefälle war aber höher als in etlichen Studien, in denen nur 0-10% Ausnahmefälle registriert wurden und das Protein infolgedessen als Surrogatmarker klassifiziert wurde (41, 114, 118, 121, 146, 153). In anderen Studien wurden wiederum ähnliche Prozentsätze an HPV-positiven Tumoren ohne p16^{INK4a}-Überexpression wie in der vorliegenden Arbeit publiziert (83, 111, 116, 154). Der hohe Prozentsatz (20%; 8/39 OPSCC) an Ausnahmefällen in der vorliegenden Arbeit war nicht etwa durch technische Probleme bedingt, sondern reflektierte vielmehr die wirklichen Unterschiede in der Biologie von HPV-assoziierten OPSCC und HPV-assoziierten Zervixkarzinomen (CxCa). In einer parallelen CxCa-Studie konnte gezeigt werden, dass mittels der gleichen Methode nur 5 von 301 HPV RNA-positiven Tumoren (2%) keine hohen p16^{INK4a}-Expressionslevel zeigten (155). Von den acht Patienten mit RNA⁺CxCa⁺ Tumoren, die keine hohen p16^{INK4a}-Expressionslevel aufwiesen (jeweils vier zeigten eine normale p16^{INK4a}-Expression bzw. den Verlust des Proteins; Tabelle 4-6, Kapitel 4.2.2, Ergebnisteil), waren sieben Raucher. Eventuell könnte das Rauchen als Risikofaktor bei diesen Patienten zu zusätzlichen genetischen oder auch epigenetischen Veränderungen in den Tumoren geführt haben, die dann für den Verlust bzw. für die normale Expression des Proteins verantwortlich waren.

Der Verlust der p16^{INK4a}-Expression ist typisch für HPV-negative Tumoren. Er ist entweder auf Allelverluste oder durch epigenetische Veränderungen (Hypermethylierung der DNA) des 9p21-Lokus zurückzuführen (156-158). Interessanterweise zeigten die Tumoren ohne aktive HPV-Beteiligung (RNA⁻ Gruppe) vermehrt das normale p16^{INK4a}-Expressionslevel, die HPV-negativen Tumoren (HPV⁻ Gruppe) waren dagegen erwartungsgemäß mit dem Verlust der p16^{INK4a}-Expression assoziiert. Jedoch gab es auch hier Ausnahmefälle, 21% der RNA⁻ Tumoren und 14% der HPV⁻ Tumoren, dementsprechend 17% der non-HPV Gruppe, zeigten ein hohes p16^{INK4a}-Expressionslevel (Tabellen 4-6 und 4-8, Kapitel 4.2.2, Ergebnisteil). Dieser Befund wurde ebenfalls in einigen anderen Studien berichtet (41, 114, 115). In der Studie von Smeets *et al.* (114) wurde die Überexpression als falsch-positive p16^{INK4a}-Färbungen postuliert. In der Studie von Smith *et al.* (115) wurde dagegen zum ersten Mal beschrieben, dass die Gruppe der HPV-negativen Tumoren mit hoher p16^{INK4a}-Expression ein schlechteres Überleben (sowohl OS als auch PFS) haben als die Gruppe der HPV-positiven Tumoren mit hoher p16^{INK4a}-Expression. Es ist denkbar, dass in den Fällen

von hoher p16^{INK4a}-Expression ohne aktive HPV-Beteiligung das RB selbst Mutationen trägt, was ebenfalls zur Entkopplung der p16^{INK4a}-Regulation führt.

Die bisher veröffentlichten Daten zur prognostischen Relevanz von p16^{INK4a} beim HNSCC sind kontrovers. Ein p16^{INK4a}-Verlust wurde z. B. häufig mit einer schlechten Prognose v. a. für Karzinome der Zunge (159), der Tonsille (121), der Mundhöhle (160) und HNSCC anderer Lokalisationen (161) beschrieben, wohingegen andere Studien keine prognostische Signifikanz für den Verlust des Proteins fanden (162, 163). Die p16^{INK4a}-Überexpression wurde dagegen mehrfach mit einer besseren Prognose v. a. für Patienten mit Oropharynxkarzinomen in Verbindung gebracht (41, 82, 98, 106, 112, 113, 118, 121, 146, 153, 160, 164) und dementsprechend oft als prognostisch wichtiger Marker gehandelt. Die Assoziation zwischen hoher p16^{INK4a}-Expression und einer besseren Prognose beim OPSCC spiegelt die Tatsache wider, dass sich unter den Oropharynxkarzinomen v. a. Tumoren mit aktiver HPV-Beteiligung befinden, d. h. in diesen Tumoren wird das Protein als Folge der Interaktion zwischen pRb und dem viralen Onkoprotein E7 in hohen Mengen synthetisiert (60).

Die Tumoren mit einer hohen p16^{INK4a}-Expression aus dieser Arbeit waren in der univariaten Kaplan-Meier Analyse ebenfalls mit einem besseren Überleben assoziiert. Patienten mit hoher p16^{INK4a}-Expression hatten z. B. eine mediane Überlebenszeit von 122 Monaten, während Patienten mit niedriger p16^{INK4a}-Expression nur eine mediane Überlebenszeit von 34 Monaten hatten ($p=0,03$; Logrank Test; Tabelle 4-9, Kapitel 4.2.2.3, Ergebnisteil). Jedoch verlor das Protein seine prognostische Relevanz in der multivariaten Analyse. Nach Adjustierung für die wichtigen Einflussfaktoren Geschlecht, Alter, klinisches Stadium, Therapie, Alkohol- und Tabakkonsum, hatten Patienten mit hoher p16^{INK4a}-Expression ein ähnliches Überleben wie Patienten mit niedriger p16^{INK4a}-Expression ($HR=0,74$; 95%KI 0,4-1,4). Dieser Befund, ein signifikanter Unterschied hinsichtlich des Überlebens zwischen den Proteinexpressionsmustern niedrig vs. hoch nach univariater, aber nicht nach multivariater Analyse, in der wichtige klinische und demografische Eigenschaften berücksichtigt werden, wurde auch in anderen Studien beschrieben (41, 82, 115). Dies bekräftigt die Wichtigkeit der Adjustierung auf wesentliche andere klinische Einflussgrößen.

P16^{INK4a} als Surrogatmarker wäre sicherlich exzellent geeignet, da die immunhistochemische Analyse im Vergleich zu den HPV DNA- und RNA-Analysen an den routinemäßig archivierten FFPE-Tumorbiopsien, kostengünstig und in kürzester Zeit durchgeführt werden kann. Zudem könnten die Ergebnisse von erfahrenen Pathologen direkt während der Diagnosestellung beurteilt und ausgewertet werden. Allerdings sollte p16^{INK4a} als Surrogatmarker die Tumoren mit aktiver HPV-Beteiligung detektieren und demzufolge die Patienten anzeigen, die mit einem besseren Überleben assoziiert sind. Nicht nur in der

vorliegenden Arbeit, sondern auch in anderen Studien (82, 115, 116, 153) stellte sich heraus, dass p16^{INK4a} als Marker allein aufgrund seiner ungenügenden Spezifität keine signifikanten Unterschiede hinsichtlich des Überlebens zwischen den Patientengruppen mit hoher oder niedriger Proteinexpression aufdeckte. Hier schnitt sogar die FISH deutlich besser ab; dies ist auch in anderen Studien belegt worden (114, 165).

Zusammenfassend war der Proteinmarker p16^{INK4a} zwar stark mit den RNA⁺/CxCa⁺ Tumoren dieser Studie assoziiert (zeigte eine ausreichende Sensitivität), trotzdem war p16^{INK4a} allein als Prädiktor für ein verbessertes Überleben der Patienten wesentlich schlechter als die Viruslast und die viralen RNA-Muster. P16^{INK4a} als IHC-Marker allein war aufgrund seiner ungenügenden Spezifität nicht geeignet, die Tumoren mit aktiver HPV-Beteiligung zu identifizieren, die eindeutig eine andere Tumorentität mit einem verbesserten Überleben der Patienten darstellen.

5.2.2.2 *pRb als Marker für Oropharynxkarzinome mit aktiver HPV-Beteiligung*

Das Retinoblastomprotein (pRb) wird in den Zellkernen von gesunden Schleimhäuten der gesamten Kopf-Hals Region einschließlich des Oropharynx in großen Mengen exprimiert. In HPV16 E7 exprimierenden Zellen liegen dagegen niedrige pRb-Expressionslevel vor, da das Protein aufgrund der Interaktion mit dem viralen E7 Protein abgebaut wird (166). Während sowohl die HPV⁻ als auch die Tumoren der RNA⁻ Gruppe hauptsächlich die erwarteten normalen pRb-Expressionslevel zeigten, waren die RNA⁺/CxCa⁺ Tumoren stark mit einer niedrigen Expression des Proteins assoziiert. 85% der Tumoren mit aktiver HPV-Beteiligung wiesen niedrige pRb-Expressionslevel auf (Tabelle 4-6, Kapitel 4.2.2, Ergebnisteil), was den publizierten Angaben aus der Literatur entspricht (43, 60, 83, 139, 153, 167-169). Nur sechs RNA⁺/CxCa⁺ Tumoren (15%) zeigten das für HPV-negative Tumoren typische normale pRb-Expressionslevel. Im Vergleich mit der p16^{INK4a}-Überexpression war das niedrige pRb-Expressionslevel stärker mit den RNA⁺/CxCa⁺ Tumoren assoziiert (Tabelle 4-8, Kapitel 4.2.2, Ergebnisteil).

Wie schon für p16^{INK4a} beobachtet, gab es auch bezüglich pRb bei den HPV⁻ bzw. den RNA⁻ Tumoren Ausnahmefälle mit untypisch erniedrigten pRb-Expressionsleveln. Im Vergleich zu p16^{INK4a} fiel der Anteil dieser falsch-positiven Fälle allerdings geringer aus (11% bei den HPV⁻, 14% bei den RNA⁻ OPSCC). Der geringere Anteil an Ausnahmefällen von pRb resultierte in einer besseren Prognose für die Patienten mit niedrigem Proteinlevel. Wie in Kapitel 5.2.3 diskutiert, könnten RB-Mutationen hier eine Rolle spielen. Ähnliches wurde auch in anderen Studien beobachtet (43, 60, 153, 167, 168).

Es gibt nur wenige Studien mit unterschiedlichen Ergebnissen zur prognostischen Relevanz von pRb beim OPSCC. In den Studien von Chung *et al.* (167) und Hafkamp *et al.* (153) wurde bei OPSCC Patienten keine Assoziation zwischen niedrigem pRb-Expressionslevel und einem besseren Überleben gesehen, im Gegensatz zu den Arbeiten von Andl *et al.* (60), Hong *et al.* (168) und Li *et al.* (170). Auch in der vorliegenden Arbeit wurde eine klare Assoziation zwischen pRb und dem Überleben gefunden. Die mediane Überlebenszeit von Patienten mit niedrigem pRb-Expressionslevel lag bei 122 Monaten, diejenige von Patienten mit normalem (hohem) Expressionslevel dagegen bei nur 31 Monaten ($p=0,01$; Logrank Test; Tabelle 4-9, Kapitel 4.2.2.3, Ergebnisteil). Diese Assoziation blieb – im Gegensatz zum Marker p16^{INK4a} – auch signifikant, wenn für die wichtigen Einflussfaktoren Alter, Geschlecht, klinisches Stadium, Therapie, Alkohol- und Tabakkonsum adjustiert wurde ($HR=0,53$; 95%KI 0,3-0,9). pRb war also unabhängig von den o. g. Einflussfaktoren ein relevanter Marker für die Prognose der OPSCC Patienten und damit, im Gegensatz zu p16^{INK4a}, geeignet als einzelner IHC-Marker Tumoren mit einer aktiven HPV16-Beteiligung zu identifizieren. Allerdings war die Assoziation zwischen pRb und dem besseren Überleben der Patienten schwächer als sie für den besten viralen Marker, die viralen RNA-Muster, gefunden wurde (Tabelle 4-11, Kapitel 4.2.2.3, Ergebnisteil). Die Schwäche von pRb als Surrogatmarker für die Identifizierung von OPSCC mit aktiver HPV16-Beteiligung liegt in seiner ungenügenden Spezifität.

5.2.2.3 Cyclin D1 als Marker für Oropharynxkarzinome mit aktiver HPV-Beteiligung

In etlichen Studien zum HNSCC (105, 108, 171) und zu einzelnen Kopf-Hals Regionen, v. a. bei Karzinomen der Zunge (172) und des Hypopharynx (173, 174) wurde eine Überexpression von Cyclin D1 gefunden. Diese Überexpression führt sequenziell zu einer verstärkten Aktivierung der Cyclin-abhängigen Kinasen (Cdk4, 6), einer gesteigerten Phosphorylierung von pRb, zu erhöhter S-Phase Aktivität und damit zu einer erhöhten Proliferation (175). In HPV-assoziierten OPSCC dagegen, bei denen pRb durch das E7-Onkoprotein von HPV16 inaktiviert wird, wurde keine erhöhte, sondern eine unterdrückte, niedrige Cyclin D1-Expression gefunden. Immunhistochemische Färbungen zeigten ein sehr niedriges Cyclin D1-Expressionslevel, analog zu dem in gesunder Schleimhaut (41, 60, 139, 168, 169).

In Übereinstimmung mit den zitierten Arbeiten wurde in der vorliegenden Arbeit bei 95% der Tumoren mit aktiver HPV-Beteiligung ein niedriges Cyclin D1-Expressionslevel detektiert (Tabelle 4-6, Kapitel 4.2.2, Ergebnisteil). Nur 2/40 (5%) RNA⁺/CxCa⁺ Tumoren hatten eine Überexpression von Cyclin D1.

Während das typische Cyclin D1-Expressionslevel gesunder Schleimhaut, d. h. die niedrige Cyclin D1-Expression, bei den HPV-assoziierten Tumoren zu finden war, hielten sich bei den HPV⁻ OPSCC hohe und niedrige Cyclin D1-Expressionlevel in etwa die Waage. Dies dürfte damit zusammenhängen, dass es zur Cyclin D1-Überexpression alternative onkogene Mechanismen gibt. Beispielsweise hat der Verlust von p16^{INK4a} auch vergleichbare biochemische Konsequenzen wie die Cyclin D1-Überexpression. Wie bei der vergleichbaren Studie von Hafkamp *et al.* (153) überwog auch hier in der HPV⁻ und RNA⁻ Gruppe die hohe Cyclin D-Expression mit 56% bzw. 54% geringfügig (Tabelle 4-6, Kapitel 4.2.2, Ergebnisteil). Damit war klar, dass Cyclin D1 allein ein völlig ungenügender Surrogatmarker für aktives HPV beim OPSCC ist.

Ähnlich wie für den Marker pRb wurde auch die prognostische Relevanz von Cyclin D1 bisher in nur sehr wenigen HNSCC Studien untersucht (153, 168, 170, 172). Überwiegend wurde von einem schlechteren Überleben bei hoher Cyclin D1-Expression berichtet (153, 168, 172). In der vorliegenden Arbeit wurde zwischen Patienten mit niedrigem und mit hohem Cyclin D1-Expressionslevel für das Gesamtüberleben nur ein geringfügiger Unterschied ermittelt. Patienten mit niedriger Proteinexpression hatten eine mediane Überlebenszeit von 102, Patienten mit hoher Proteinexpression hatten dagegen eine mediane Überlebenszeit von nur 32 Monaten (p=0,06, Logrank Test; Tabelle 4-9, Kapitel 4.2.2.3, Ergebnisteil). Diese prognostische Tendenz für den Marker wurde auch in der Studie von Li *et al.* (170) gezeigt. Im Gegensatz zu den Studien von Hafkamp *et al.* (153) und Hong *et al.* (168) wurde in der vorliegenden Arbeit auch im multivariaten Modell kein Überlebensvorteil für Patienten mit einer niedrigen gegenüber den Patienten mit einer hohen Cyclin D1-Expression gefunden. Es war für die Patienten lediglich eine Tendenz erkennbar, vergleichbar zu der des Markers p16^{INK4a} (Tabelle 4-11, Kapitel 4.2.2.3, Ergebnisteil).

Zusammenfassend ist zu konstatieren, dass Cyclin D1 trotz der sehr guten Übereinstimmung zwischen niedrigem Expressionlevel und den viralen RNA-Mustern sich nicht als Surrogatmarker eignet, OPSCC mit aktiver HPV-Beteiligung zu identifizieren.

5.2.2.4 p53 als Marker für Oropharynxkarzinome mit aktiver HPV-Beteiligung

Das Tumorsuppressorprotein p53 liegt in den Zellen gesunder Mundschleimhaut aufgrund seiner kurzen Halbwertszeit in nur sehr niedriger Konzentration vor, immunhistochemisch nachweisbar ist es daher nur mit Signalverstärkung (TSA-IHC). In HPV-negativen Plattenepithelkarzinomen des Kopf-Hals Bereichs ist p53 häufig mutiert (die Angaben schwanken zwischen 30% und 70%), hervorgerufen durch die Hauptrisikofaktoren Tabak- und Alkoholkonsum (68, 101, 176, 177). Die meisten Mutationen sind Punktmutationen, sie

führen zu einer Stabilisierung des mutierten Proteins, was in der IHC als Überexpression sichtbar wird, während in einer kleineren Gruppe so genannte Nonsense-Mutationen vorliegen, die zu einem völligen Verlust der Proteinexpression führen und als negative Färbung auch in der TSA-IHC resultieren. Im Kontext der hier vorliegenden Arbeit ist jedoch wichtig, dass ein erheblicher Teil der HPV⁻ Tumoren die normal niedrigen p53-Expressionslevel, vergleichbar zu denen gesunder Schleimhaut, aufweisen. In HPV-assoziierten Tumorzellen, in denen p53 fast ausnahmslos als Wildtyp vorliegt (43, 60, 68, 78, 80, 84, 87, 97-100), würde man theoretisch ebenfalls eine negative Anfärbbarkeit des Proteins in der IHC erwarten, da das E6-Onkoprotein von HPV16 den verstärkten proteolytischen Abbau von p53 induziert. Tatsächlich kann man jedoch auch in HPV-transformierten Tumorzellen kleine Mengen von p53 nachweisen. Außerdem konnte gezeigt werden, dass das Protein in diesen Tumorzellen durch Bestrahlung oder Chemotherapeutika stabilisiert und funktionell aktiviert werden kann (178).

In Übereinstimmung mit den oben genannten Arbeiten waren die Tumoren mit aktiver HPV-Beteiligung in der vorliegenden Arbeit mit einer normalen p53-Expression assoziiert; 73% der RNA⁺/CxCa⁺ Tumoren wiesen normale (niedrige) p53-Expressionslevel auf. Ebenfalls in Übereinstimmung mit anderen Arbeiten (99, 167, 179) zeigten jedoch auch 11/40 (27%) RNA⁺/CxCa⁺ Tumoren eine aberrante p53-Expression. Wie damit zu erwarten war, wies p53 allein gegenüber den anderen drei IHC-Markern die geringste Sensitivität und demzufolge die schwächste Assoziation mit den RNA⁺/CxCa⁺ Tumoren auf (Tabelle 4-8, Kapitel 4.2.2, Ergebnisteil). Die Mehrzahl der RNA⁺/CxCa⁺ Tumoren mit aberrant hoher p53-Expression (7 von 11) gehörten zu der unten beschriebenen Gruppe mit sehr niedrigen Kopienzahlen der E6*-Transkripte (siehe unten, Kapitel 5.2.3). Die Assoziation von HPV16 mit dem normal erscheinenden p53-Expressionlevel wird dahingehend interpretiert, dass es in den HPV-induzierten Tumoren eine Konkurrenz zwischen Induktion des proteolytischen Abbaus von p53 durch das virale Onkoprotein E6 und der Aktivierung des Proteins durch eben diesen onkogenen Stress gibt. Diese übereinstimmenden Befunde einschließlich der oben erwähnten Experimente an den HeLa-Zellen (178) werden als ein möglicher Mechanismus für das gute Ansprechen der HPV-assoziierten Tumoren auf Strahlen- und Chemotherapie angesehen.

Die Gruppen HPV⁻ und RNA⁻ waren sich bezüglich der p53-Expression sehr ähnlich. Beide Gruppen waren hauptsächlich entweder durch die Überexpression oder den Verlust des Proteins charakterisiert, aber auch der Anteil der Tumoren mit normalem (niedrigem) p53-Expressionslevel in diesen Gruppen war nicht unwesentlich (27 von 148; 18%). Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit anderen Studien (78, 98, 99, 118, 167, 179) In einer Studie von Bosch *et al.* (101) wurde gezeigt, dass die aberranten Proteinexpressionslevel in

diesen Gruppen auf Mutationen im TP53-Gen begründet sind, der Verlust des Proteins hauptsächlich auf sog. Nonsense-Mutationen, die Überexpression auf sog. Missense-Mutationen.

Wie zu erwarten, hatte p53 allein bei den OPSCC dieser Studie keine prognostische Relevanz, in Übereinstimmung mit der Mehrzahl der publizierten Arbeiten zum OPSCC (82, 98, 167, 179, 180). Weder in univariater noch in multivariater Analyse wurde ein Überlebensvorteil für Patienten mit normaler p53-Expression gefunden (Tabelle 4-11 und Abbildungen 4-20 und 4-21, 4.2.2.3, Ergebnisteil).

P53 allein kann damit nicht als Surrogatmarker für die Identifizierung eines HPV-assoziierten Tumors herangezogen werden kann. Es wurde zwar eine signifikante Assoziation zwischen einem normalen p53-Expressionslevel und der RNA⁺/CxCa⁺ Gruppe gefunden, diese war jedoch schwächer als die für die anderen drei IHC-Marker. Außerdem war das Protein für die Vorhersage der Prognose der Patienten nicht von Bedeutung.

5.2.3 Proteinkombinationen als Marker für Oropharynxkarzinome mit aktiver HPV-Beteiligung

Aus den Untersuchungen der vier IHC-Marker ging kein einziger Marker hervor, der eine vergleichbare prognostische Relevanz zeigte, wie sie für den besten viralen Marker ‚RNA-Muster‘ bestimmt wurde. Die Ergebnisse aus den IHC-Einzelanalysen deuteten allerdings auch darauf hin, dass gegebenenfalls durch die Kombination der zellulären Marker nicht nur die falsch-negativen, sondern vor allem auch die falsch-positiven Fälle verringert werden könnten und demzufolge die Assoziation mit den RNA⁺/CxCa⁺ Tumoren und somit auch mit einem verbesserten Überleben erhöht werden könnte.

Die Assoziation zwischen dem zellulären Expressionsmuster p16^{INK4a}-hoch/pRb-niedrig und HPV-assoziierten Kopf-Hals Tumoren wurde schon in einigen Studien untersucht (43, 156, 169) und erstmals in einer Arbeit von Andl *et al.* (60) beschrieben. Auch in der vorliegenden Arbeit deutete vieles auf die Wichtigkeit dieses Expressionsmuster hin; p16^{INK4a} stand mit dem zellulären Marker pRb in signifikant inverser Beziehung. Diese Ergebnisse sind in Übereinstimmung mit der biochemischen Wirkungsweise des viralen E7 Proteins: Ist pRb durch das E7 Protein inaktiviert, kommt es zu einer Akkumulierung des p16^{INK4a}-Proteins. Dieses ist aber nicht länger fähig, die Zellzyklusprogression zu inhibieren, da pRb auch sein Substrat ist. Es zeigte sich genau für diese Kombination der zwei zellulären Marker in der vorliegenden Arbeit die stärkste Assoziation mit den RNA⁺/CxCa⁺ Tumoren. Alle Tumoren mit aktiver HPV-Beteiligung, die eine hohe p16^{INK4a}-Expression zeigten, hatten gleichzeitig

auch eine niedrige pRb-Expression (Tabelle 4-6, Kapitel 4.2.2, Ergebnisteil). Zwar verlor die Kombination gegenüber dem Einzelmarker pRb etwas an Sensitivität (85% vs. 79%), dafür wurden aber durch die Kombination vor allem die falsch-positiven Fälle verringert und damit die Spezifität deutlich erhöht (86% vs. 94%). Dies spiegelte sich auch in der prognostischen Relevanz dieser zellulären Markerkombination wider. Der Unterschied für die Markerkombination im Vergleich zu pRb allein zwischen den entsprechenden Patientengruppen hinsichtlich eines besseren Überlebens vergrößerte sich nicht nur, er war sogar vergleichbar mit dem, der für den besten viralen Einzelmarker (RNA-Muster) berechnet wurde (Tabelle 4-16, Kapitel 4.3.2, Ergebnisteil). Die prognostische Relevanz einer Kombination aus p16^{INK4a}-Überexpression und niedriger pRb-Expression wurde auch in anderen Studien gezeigt (60, 170), diese Tumoren zeigten zusätzlich häufig eine niedrige Cyclin D1-Expression (60, 170). In der vorliegenden Arbeit wurde diagnostisch und auch prognostisch weder ein Vorteil noch ein Nachteil für diese Dreierkombination (p16^{INK4a}/pRb/Cyclin D1) gegenüber der Zweierkombination (p16^{INK4a}/pRb) erreicht.

Die Resultate aller anderen möglichen Kombinationen waren analog. Beispielsweise war die Assoziation zwischen der Kombination p16^{INK4a}-hoch/pRb-niedrig/p53-normal oder auch der Viererkombination mit den RNA⁺/CxCa⁺ Tumoren zwar etwas stärker als die für die Kombination p16^{INK4a}/pRb, jedoch wurde hinsichtlich des prognostischen Potentials kein weiterer Zugewinn erreicht (Tabelle 4-16, Kapitel 4.3.2, Ergebnisteil).

Hinsichtlich der RNA⁺/CxCa⁺ Patienten mit untypischen Proteinexpressionsleveln, zeigten von den sechs RNA⁺/CxCa⁺ Tumoren mit normalem pRb-Expressionslevel fünf Tumoren auch keine hohe p16^{INK4a}-Expression; einer der sechs RNA⁺/CxCa⁺ Tumoren war für p16^{INK4a} nicht auswertbar. Die betroffenen fünf RNA⁺/CxCa⁺ Patienten mit untypischem Expressionsmuster (p16^{INK4a}-niedrig/pRb-normal) waren alle Raucher (wie bereits oben im Kapitel 5.2.2.1 festgestellt wurde). Es könnte also sein, dass durch das Proteinexpressionsmuster in den Tumoren nur ein intaktes pRb vorgetäuscht wird, und dass Mutationen im Gen RB (z. B. in einer für die Interaktion mit dem E7-Protein notwendigen Sequenz) die Bindung von E7 und damit den Abbau von pRb verhindern. Die Regulation von p16^{INK4a} durch pRb könnte bei den Tumoren mit niedriger p16^{INK4a}-Expression intakt geblieben sein oder die bereits oben erwähnten epigenetischen Veränderungen am p16^{INK4a}-Lokus könnten den Verlust von p16^{INK4a} verursacht haben.

Die zwei RNA⁺/CxCa⁺ Tumoren mit untypischer Cyclin D1-Überexpression zeigten beide auch gleichzeitig eine untypische (normal hohe) pRb-Expression. Einer der beiden Tumoren hatte zusätzlich ein niedriges p16^{INK4a}-Expressionslevel, der andere war für p16^{INK4a} nicht auswertbar. Beide Patienten wiesen außerdem deutliche Gemeinsamkeiten in den

biologischen Eigenschaften ihrer Tumoren und in ihren klinischen Krankheitsverläufen auf: Die Tumoren hatten eine sehr niedrige Viruslast und die viralen RNA-Muster deuteten auf integrierte HPV16 Genome hin. Die Kopienzahl der E6*-Transkripte war allerdings sehr niedrig (an der Nachweisgrenze gelegen). Der eine Fall zeigte weniger als 250 E6*II-Kopien, im anderen Fall konnte E6*II nicht nachgewiesen werden und E6*I lag unter 25 Kopien. Diese Daten basieren auf einem Cut-off, der für die Unterscheidung zwischen niedrig-gradigen und hochgradigen Läsionen der Zervix bzw. Zervixkarzinomen generiert wurde. Wahrscheinlich sollte man diesen Cut-off beim OPSCC erhöhen, um die Tumoren mit aktiver HPV-Beteiligung von solchen zu differenzieren, die für E6*-Transkripte falsch-positive Fälle darstellen. Dies ist in Zukunft an einer größeren Fallserie von OPSCC mit geringer Expression der E6*-Transkripte zu klären. Im Einklang mit diesen Überlegungen sind die klinischen Verläufe dieser beiden Patienten zu sehen: Beide hatten ein stark fortgeschrittenes Tumorstadium und erhielten infolgedessen primär eine Radio- und/oder Chemotherapie. Beide Patienten waren Raucher, es trat bei beiden ein Lokalrezidiv bzw. ein Zweitkarzinom auf und beide Patienten sind an den Folgen ihrer Tumorerkrankung verstorben. Alle diese Eigenschaften sprechen dafür, dass es sich bei den Tumoren dieser Patienten um Tumoren ohne aktive HPV-Beteiligung handelte.

Vier der 11 RNA⁺/CxCa⁺ Tumoren mit aberrantem p53-Expressionslevel zeigten dennoch in den anderen drei IHC-Markern die typischen Expressionsmuster für HPV-assoziierte Tumoren (p16^{INK4a}-hoch, pRb-niedrig, Cyclin D1-niedrig). Offensichtlich war das virale Onkoprotein E6 in diesen Tumoren nicht in der Lage, alle p53-Proteinmoleküle in den proteolytischen Abbau zu treiben. Dieser Befund wurde auch für die klassische HPV-positive Tumorzelllinie, die HeLa-Zellen, so beschrieben (178). In einer Studie von Hafkamp *et al.* (78) wurden z. B. bei acht von 10 HPV-positiven Oropharynx Tumoren eine hohe p53-Expression festgestellt, jedoch wurden für keinen dieser Tumoren p53-Mutationen nachgewiesen. Ursachen für die Hochregulierung des Wildtyp-p53-Genproduktes können beispielsweise genotoxische Insulte (UV-Strahlung oder Hypoxie) sein (181), zum anderen kann sie auf der Stabilisierung von p53 (inaktive Form) durch mdm2 (182) oder viraler Proteine, wie das große T-Zell-Antigen des SV40-Virus (78) beruhen. Die übrigen sieben RNA⁺/CxCa⁺ Tumoren mit aberrantem p53-Expressionslevel zeigten dagegen zusätzlich zumindest für p16^{INK4a} und pRb die für HPV-negative Tumoren typischen Expressionsmuster (p16^{INK4a}-niedrig, pRb-normal). Zwei dieser sieben Tumoren wurden oben schon genauer beschrieben, diese zeigten das typische Proteinexpressionsmuster der HPV-negativen Tumoren demzufolge in allen vier Proteinmarkern. Die übrigen fünf hatten drei gemeinsame Eigenschaften: obwohl alle fünf Patienten Raucher waren, ist keiner der Patienten an seiner Tumorerkrankung verstorben oder hat ein Rezidiv erleiden müssen. Dies deutet auf ein

verbessertes Ansprechen der Therapie hin und lässt daher wiederum auf eine aktive Beteiligung von HPV schließen. Diese Tatsache unterstreicht die Wichtigkeit der viralen Marker gegenüber den zellulären Markern.

Betrachtet man die Ergebnisse der Markerkombinationen im Vergleich zu den Einzelmarkern allein, so kann die Kombination, insbesondere die von p16^{INK4a} und pRb eher als Marker für einen Tumor mit aktiver HPV-Beteiligung gelten. Dennoch erreichte keine Kombination eine Sensitivität oder Spezifität von 100% für die Klassifizierung der RNA⁺/CxCa⁺ Tumoren.

Zusammenfassend wurde aus den Analysen der zellulären Marker deutlich, dass die vier IHC-Marker p16^{INK4a}, pRb, Cyclin D1 und p53 allein zwar stark mit den OPSCCs und aktivem HPV16 assoziiert waren, jedoch nicht alle Marker ein ausreichend prognostisches und diagnostisches Potential aufwiesen, die HPV-assoziierten Tumoren zu identifizieren. Die Proteine als IHC-Marker allein sind keineswegs als Surrogatmarker für Tumoren mit aktiver HPV-Beteiligung geeignet. Dagegen war die Kombination der zellulären Marker, insbesondere die von hohem p16^{INK4a}- und niedrigem pRb-Expressionslevel, die eine wirklich einfache sowie praktikable Methodik in der Routinediagnostik darstellen könnte, besser geeignet, die Tumoren mit aktiver HPV-Beteiligung zu identifizieren und zeigte außerdem beste prognostische Eigenschaften. Die prognostischen Eigenschaften dieser Kombination waren nur marginal schlechter als die des besten viralen Markers, den RNA-Mustern. Zusätzlich wurde gezeigt, dass die Tumoren ohne aktive HPV-Beteiligung die gleichen Proteinexpressionsmuster aufwiesen, wie die HPV-negativen Tumoren. Steht also nur FFPE-Material zur Verfügung, so kann zur Identifizierung der OPSCCs mit aktiver HPV-Beteiligung die IHC der Proteine p16^{INK4a} und pRb angewandt werden.

5.3 Kombination zellulärer Proteinmarker und HPV16 DNA-Status

Dass die Kombination von zellulären Proteinmarkern und HPV16 DNA-Status gegenüber den Einzelmarkern allein Vorteile bringt, um die Tumoren mit aktiver HPV-Beteiligung zu identifizieren und schließlich auf diese Weise die Patienten mit einem besseren Überleben genauer zu definieren, wurde schon in einigen anderen Studien belegt (83, 99, 112, 114-116, 118, 119, 179).

Insbesondere der von Smeets *et al.* (114) vorgeschlagene Algorithmus, der auf der p16^{INK4a} immunhistochemischen Analyse und einer anschließenden HPV PCR bei den Tumoren mit hohem p16^{INK4a}-Expressionslevel beruht, konnte auch in anderen Studien vor allem mit einem besseren Überleben für die Patienten mit p16^{INK4a}-hoch/HPV DNA-positiv in

Zusammenhang gebracht werden (112, 115, 118, 119). Die von Smeets *et al.* (114) postulierte Sensitivität und Spezifität von jeweils 100% konnte jedoch in keiner dieser Studien bestätigt werden. Im Vergleich zu dem zellulären Marker p16^{INK4a} allein, wurde in der vorliegenden Arbeit durch die Kombination von hohem p16^{INK4a}-Expressionslevel und der Anwesenheit von HPV16 DNA (HPV⁺) die Spezifität von 83% auf 92% erhöht, die Sensitivität (79%) wurde dagegen nicht verbessert. Für diese Kombination wurde zwar auf Grund der verringerten Anzahl der falsch-positiven Fälle eine leicht verbesserte prognostische Relevanz gefunden, jedoch war auch nach Berücksichtigung des HPV DNA-Status analog zu p16^{INK4a} allein kein signifikanter Unterschied zwischen den Patientengruppen zu erkennen (Tabelle 4-18, Kapitel 4.3.3, Ergebnisteil), ein Befund der in Einklang mit einer anderen Studie steht (116). Dies ist hauptsächlich darauf zurückzuführen, dass trotz der Kombination von p16^{INK4a} und dem HPV DNA-Status immer noch 8/40 (20%) RNA⁺/CxCa⁺ Tumoren nicht als solche klassifiziert wurden, aber zusätzlich 8% der non-HPV Tumoren das Muster p16^{INK4a}-hoch/HPV⁺ zeigten.

Die Kombination der anderen zellulären Marker mit dem HPV DNA-Status resultierte in dieser Arbeit vor allem in einer erhöhten Spezifität, die Sensitivität blieb dadurch jeweils unverändert. Beispielsweise wurde für die Kombination pRb/HPV16 DNA die Spezifität von 86% auf 93% und für die Kombination p16^{INK4a}/pRb/HPV16 DNA von 94% auf 97% erhöht. Dies spiegelte sich auch in der prognostischen Relevanz dieser Kombinationen wider. Vor allem die Kombination pRb/HPV16 DNA zeigte einen deutlich besseren Überlebensvorteil für die Patienten als die Marker jeweils allein. Für die Kombination p16^{INK4a}/pRb/HPV16 DNA wurde dagegen kein weiterer prognostischer Vorteil für die Patienten berechnet, die Gruppengrößen unterschieden sich hier nur durch vier Patienten, was zu gering ist, um einen Effekt im multivariaten Überlebensmodell erkennen zu können. Die Markerkombination der zellulären Proteine p16^{INK4a}/pRb zeigte aber ohnehin schon vergleichbar gute prognostische Eigenschaften mit dem Marker ‚RNA-Muster‘.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit die Validität sowie die Zuverlässigkeit des ‚Smeets‘-Algorithmus‘ nicht bestätigt werden. Es gab sowohl unter den Tumoren mit aktiver HPV-Beteiligung als auch unter den HPV-negativen Tumoren zu viele Ausnahmefälle, die durch diese Markerkombination infolgedessen falsch klassifiziert worden wären. Außerdem konnten die Patienten mit einem besseren Überleben durch diese Kombination nicht ermittelt werden, daher ist sie als Marker für eine aktive HPV-Beteiligung nicht empfehlenswert. Trotzdem ist die Kombination für die Identifizierung einer aktiven HPV-Beteiligung besser geeignet als der Marker p16^{INK4a} allein. Die Kombination des HPV16 DNA-Status mit pRb oder p16^{INK4a}/pRb erwies sich dagegen als wertvoll. Insbesondere die Kombination der drei Marker p16^{INK4a}, pRb und HPV16 DNA zeigte eine sehr starke Assoziation mit den

RNA⁺/CxCa⁺ Tumoren und mit einem besseren Überleben. Jedoch wären auch hier zu viele der RNA⁺/CxCa⁺ Tumoren (20%) als HPV-negativ klassifiziert worden, so dass für die Identifizierung der Tumoren mit aktiver HPV-Beteiligung die viralen RNA-Muster als Marker klar vorzuziehen sind. Ist jedoch nur FFPE-Material zur Verfügung, dann eignet sich die Kombination der zellulären Marker p16^{INK4a}/pRb, wenn möglich zusammen mit der HPV16 DNA-Analyse, am besten für die Klassifizierung der Tumoren.

5.4 Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit waren sehr viel versprechend, was geeignete Marker zur Identifizierung der Kopf-Hals Tumoren mit aktiver HPV-Beteiligung betrifft. Es konnte nicht nur gezeigt werden, dass die Expressionsanalyse der viralen Onkoproteine E6/E7 von Bedeutung ist, sondern viel mehr noch dass die viralen RNA-Muster, die spezifisch bei hochgradigen Läsionen der Zervix und bei Zervixkarzinomen gefunden wurden (39), auch bei der aktiven Beteiligung von HPV16 beim HNSCC eine entscheidende Bedeutung hat und als Marker am besten geeignet zu sein scheinen. Trotz der geringen Fallzahlen an RNA⁺ Tumoren ohne die viralen RNA-Muster (RNA⁺/CxCa⁻ n=8), konnten richtungsweisende Erkenntnisse über die Tumoren mit viralen RNA-Mustern (RNA⁺/CxCa⁺) gewonnen werden.

Für die Tumoren ohne aktive HPV-Beteiligung, konnte zudem gezeigt werden, dass sie sich klinisch sowie biologisch von den HPV-negativen Tumoren nicht unterscheiden. Sie zeigten ähnliche zelluläre Proteinexpressionsmuster und die Patienten hatten eine ähnliche Prognose. Für die Zukunft ist demzufolge eine Differenzierung nach HPV RNA-Mustern für den Patienten entscheidend, wenn man davon ausgeht, dass diese Patienten unabhängig der verabreichten Therapie eine gute Prognose haben. Es könnte daher in Zukunft untersucht werden, ob Patienten mit aktivem HPV16 weniger aggressive Behandlungsmodalitäten erhalten könnten, um dadurch eine bessere Lebensqualität sowie geringere Nebenwirkungen zu erfahren.

Durch die zellbiologischen Untersuchungen konnte die Eignung von p16^{INK4a} mit sowie ohne Berücksichtigung des HPV DNA-Status als Surrogatmarker klar widerlegt werden, an dessen Stelle ist die Kombination der zellulären Marker p16^{INK4a} und pRb getreten. Insbesondere die Kombination von HPV DNA-Analyse zusammen mit den zellulären Markern hat sich hier als besonders effizient für die Identifizierung der Tumoren mit aktiver HPV-Beteiligung bewiesen. Solange keine für die Routinediagnostik geeigneten Tests für die RNA-Muster zur Verfügung stehen, könnte die Identifizierung anhand der zellulären Marker ggf. in Ergänzung mit der HPV DNA angewandt werden.

Durch die Erkenntnisse dieser Arbeit können in Zukunft auch Tumoren anderer Kopf-Hals Lokalisationen auf eine mögliche HPV-Beteiligung auf diese Weise identifiziert werden. Außerdem sollten sie Grund geben, geeignete, praktikable und im Hochdurchsatzverfahren anwendbare Tests zu entwickeln, mit deren Hilfe eine schnelle und kostengünstige Identifizierung der RNA⁺/CxCa⁺ Tumoren gelingt. Auf diese Weise könnte schnell und unkompliziert der funktionelle HPV-Status der Patienten bestimmt werden und daraufhin in großen randomisierten prospektiven Studien analysiert werden, welche Behandlungsmodalitäten für die entsprechenden Patienten am besten in Frage kommen.

6 EIGENE PUBLIKATIONEN

6.1 Publierte Artikel

Nasser W, Flechtenmacher C, **Holzinger D**, Hofele C and Bosch FX: **Aberrant Expression of p53, p16INK4a and Ki-67 as Basic Biomarker for Malignant Progression of Oral Leukoplakias**, J Oral Pathol Med. 2011 Mar 25. doi: 10.1111/j.1600-0714.2011.01026.x. [Epub ahead of print] PMID: 21435003

Roesch-Ely M, Leipold A, Nees M, **Holzinger D**, Dietz A, Flechtenmacher C, Wolf T, Zapatka M, Bosch FX: **Proteomic analysis of field cancerization in pharynx and oesophagus: a prospective pilot study**; J Pathol 2010; 221: 462–470.

6.2 Eingereichte Artikel oder Artikel in Bearbeitung

Holzinger D, Schmitt M, Dyckhoff G, Benner A, Pawlita M, Bosch FX: **Viral RNA Patterns and High Viral Load Define Oropharynx Carcinomas with Active HPV16 Involvement**. Cancer Research (submitted)

Holzinger D, Flechtenmacher C, Henfling N, Kaden I, Grabe N, Lahrmann B, Schmitt M, Heß J, Pawlita M, Bosch FX: **Immunohistochemical Identification of Oropharyngeal Squamous Cell Carcinomas with Active HPV16**. (in Bearbeitung)

7 PATENTANMELDUNG

Schmitt M, Pawlita M, **Holzinger D**, Bosch FX, 2011. **Means and methods for predicting the risk of mortality of patients with HPV-positive oropharyngeal squamous cell cancer**. I.Z. P-988, U.Z. DK10551EP

8 ABKÜRZUNGEN

A	Adenin
Abb.	Abbildung
AMV-RT	<i>Avian myeloblastosis virus</i> -Reverse Transkriptase
ATP	Adenosin-5'-Triphosphat
Bg	Beta-Globin
bp	Basenpaare
BS	Breitspektrum
bzw.	Beziehungsweise
ca.	Circa
Cdk	Cyclin-abhängige Kinase
cDNA	Komplementäre DNA
°C	Grad Celsius
C	Cytosin
CxCa	Zervixkarzinom
CyD1	Cyclin D1
ds	Doppelstrang-
d. h.	Das heißt
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DAPI	4,6-Diamidino-2-phenylindoldihydrochlorid
ddH ₂ O	Di-destilliertes Wasser
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat
E	<i>Early</i> , HPV Gene und Genprodukte
E. coli	<i>Escherichia coli</i>
EDC	N-(3-dimethylaminopropyl)-N-ethylcarbodiimid
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>et al.</i>	<i>Et alteri</i> (und andere)
EtOH	Ethanol
FA	Formaldehyd
FISH	Fluoreszenz <i>In-Situ</i> Hybridisierung
G	Guanin
g	Gramm
g	Gravitationskonstante

GP	<i>General primer</i>
h; Std.	Stunde
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HCl	Salzsäure (Chlorwasserstoff)
HE	Hämalaun-Eosin
HNSCC	Kopf-Hals Tumor (<i>head and neck squamous cell carcinoma</i>)
HPLC	<i>High performance liquid chromatography</i>
HPV	Humanes Papillomvirus
HPV ⁺	HPV16 DNA-positive Tumoren
HPV ⁻	HPV DNA-negative Tumoren
HPV _{high}	hohe Viruslast
HPV _{low}	niedrige Viruslast
HPV _{transf} ⁺	HPV transformierte OPSCCs, Tumoren mit hoher Viruslast und/oder viralen RNA-Mustern
HPV _{transf} ⁻	Tumoren mit niedriger Viruslast und ohne virale RNA-Muster
HR	Hazard Ratio
hrHPV	„Hochrisiko“-(<i>high-risk</i>) HPV
HSIL	Hochgradige intraepitheliale Läsion (<i>high grade squamous intraepithelial lesion</i>)
ID	Identitätsnummer
IHC	Immunhistochemie
kDa	Kilo-Dalton (Masseinheit für Moleküle)
KI	Konfidenzintervall
l	Liter
L	<i>Late</i> , HPV Gene und Genprodukte
LCR	<i>Long control region</i>
lrHPV	„Niedrigrisiko“-(<i>low-risk</i>) HPV
LSIL	Niedriggradige intraepitheliale Läsion (<i>low-grade squamous intraepithelial lesion</i>)
M	Molar
MeOH	Methanol
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
MFI	Mediane Fluoreszenzintensität
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
ml	Milliliter

mM	Millimolar
MPG	Multiplex Genotypisierung
mRNA	Boten (<i>messenger</i>)-RNA
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
µM	Mikromolar
n	Anzahl
n	Nano-
n.a.	Nicht analysierbar
NASBA	<i>Nucleic Acid Sequence Based Amplification</i>
ng	Nanogramm
nm	Nanometer
non-HPV	HPV-negative plus HPV DNA-positive Tumoren ohne virale RNA-Muster
NPV	Negativer Vorhersagewert
nt	Nucleotid
OP	Operation/Operationssaal
OPSCC	Plattenepithelkarzinom im Oropharynx (<i>oropharyngeal squamous cell carcinoma</i>)
OR	Odds Ratio
ORF	Offenes Leseraster (<i>open reading frame</i>)
Oro/Sonst.	Oropharynx/Sonstige
Oro/Tons	Oropharynx/Tonsille
Oro/Zgr	Oropharynx/Zungengrund
P	Wahrscheinlichkeit
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> , Phosphatsalz-Puffer
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PFA	Paraformaldehyd
pH	<i>Potentia hydrogenii</i> (negativer dekadischer Logarithmus der Protonenkonzentration)
PPV	Positiver Vorhersagewert
pRb	Retinoblastomprotein
Q	Kalibrator
qPCR	Quantitative <i>real-time</i> PCR
r	Korrelationskoeffizient

R/C	Radio- und/oder Chemotherapie
RNA	Ribonukleinsäure
RNA ⁺	HPV16 E6*II/E6*I-positive Tumoren
RNA ⁻	HPV16 E6*II/E6*I-negative Tumoren
RNA ⁺ /CxCa ⁺	HPV16 E6*II/E6*I-positive Tumoren mit viralen RNA-Mustern
RNA ⁺ /CxCa ⁻	HPV16 E6*II/E6*I-positive Tumoren ohne virale RNA-Muster
rpm	Rotationen pro Minute
RT	Raumtemperatur
S	Stroma
s; sec	Sekunde
SDS	Natriumdodecylsulfat
Se	Sensitivität
Sp	Spezifität
SSC	Standard-Natrium-Citrat
ssDNA	Einzelstrang-DNA
Strep-PE	Streptavidin-Phycoerythrin
T	Thymin
T	Tumor
Tab.	Tabelle
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TMA	Gewebechip (Tissue Microarray)
TMAC	Tetramethylammoniumchlorid
Tris	Tris(hydroxymehtyl)-aminomehtan
tRNA	Transfer-RNA
TSA	Tyramid-Signal-Amplifikation
Tween 20	Polyoxyethylen-sobitan-monolaurat
U	Unit (Einheit der Enzymaktivität)
Ubc	Ubiquitin C
U/min	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
vs.	<i>Versus</i>
wt	Wildtyp
z. B.	Zum Beispiel

9 ANHANG

Tabelle 9-1: Patienten- und Tumoreigenschaften und Ergebnisse der viralen und zellulären Marker.

ID ¹	Gender ²	Age	OPSCC subsite ³	T	N	M	Clinical Stage	Tobacco ⁴	Alcohol ⁴	Firstline Therapy ⁵	Recurrence ⁶	Secondary Carcinoma ⁶	Lymphnode Metastasis ⁶	Distant Metastasis ⁶	OS (months)	OS status ⁶	PFS (months)	PFS status ⁶
5	1	51	1	2	2	0	IV	1	2	1	1	1	0	1	160	1	60	1
44	1	50	1	4	1	0	IV	1	1	1	0	1	0	0	27	1	24	1
47	1	40	1	4	0	0	IV	1	1	2	1	0	1	0	27	1	26	1
54	1	39	3	3	0	0	III	1	1		0	0	0	0	175	0	175	0
63	2	66	3	2	2	0	IV	1	1	1	0	0	0	0	137	0	137	0
65	2	76	3	3	1	0	III	0	1	1	0	0	0	0	87	0	87	0
83	1	41	2	3	2	0	IV	1	1	2	1	0	0	0	210	0	52	1
84	2	82	2	2	0	0	II	0	0		0	0	0	0	10	0	10	0
89	2	57	3	4	0	0	IV	1	1	2	1	0	0	0	14	1	11	1
91	1	49	3	2	0	0	II	1	1	1	0	0	0	0	109	0	109	0
95	1	46	3	4	3	0	IV	2	1	2	0	0	0	0	122	1	122	0
114	1	48	1	2	2		IV	2	1	1	0	0	0	0	7	1	7	0
117	1	41	1	3	2	0	IV	1	1	1	0	1	0	0	180	0	145	1
122	1	57	3	2	0	0	II	1	1	1	0	1	0	0	56	0	54	1
124	1	71	3	3	2	0	IV	1	1	1	0	0	0	0	151	0	151	0
146	1	49	3	2	2	0	IV	1	1		0	0	0	0	1	0	1	0
167	1	52	1	3	0	0	III	2	2	1	0	0	0	0	96	0	96	0
185	1	42	3	4	2	0	IV	1	1	2	0	0	0	0	101	0	101	0
200	1	49	3	2	0	0	II	1	1	1	0	1	1	1	112	0	61	1
217	1	65	1	4	2	0	IV	1	2	1	1	0	1	1	14	1	9	1
266	1	64	1	3	2	0	IV	1	1	1	0	1	0	0	25	1	20	1
270	1	47	3	4	2	0	IV	1	1	1	0	0	0	1	13	1	12	1
289	1	44	2	3	0	0	III	1	2	1	0	0	0	0	8	0	8	0
294	1	67	3	4	3	0	IV	1	1	2	0	0	1	1	13	1	8	1
329	2	57	1	3	2	0	IV	1	0	1	0	1	1	0	87	1	55	1
339	2	54	1	2	2	0	IV	1	0	1	0	0	0	1	102	1	7	1
345	1	46	3	4	2	0	IV	1	1	1	1	0	0	0	9	1	7	1
349	1	58	3	4	2	0	IV	1	1	1	1	0	0	0	7	1	5	1
350	1	47	3	2	2	0	IV	1	1	1	0	0	0	0	169	0	169	0
386	1	54	3	3	2	1	IV	1	1		0	0	0	1	3	1	3	1
391	1	58	2	2	2	0	IV	1	1	1	0	0	0	1	12	1	12	1
426	1	62	1	2	0	0	II	1	1	1	1	1	0	0	211	0	121	1

ID ¹	Gender ²	Age	OPSCC subsite ³	T	N	M	Clinical Stage	Tobacco ⁴	Alcohol ⁴	Firstline Therapy ⁵	Recurrence ⁵	Secondary Carcinoma ⁵	Lymphnode Metastasis ⁵	Distant Metastasis ⁵	OS (months)	OS status ⁶	PFS (months)	PFS status ⁶
471	1	48	3	2	1	0	III	2	1	1	0	0	0	0	203	0	203	0
473	1	63	1	4	1	0	IV	2	2	1	0	0	0	0	165	0	165	0
480	1	59	2	4	2	0	IV	1	1	1	0	0	0	0	162	0	162	0
481	1	54	1	2	0	0	II	2	1	1	1	0	1	0	44	1	18	1
492	2	62	3	3	2	0	IV	1	1	1	0	0	0	0	62	0	62	0
494	1	59	3	2	0	0	II	1	2	1	0	1	0	0	145	1	129	1
526	1	57	3	4	2	0	IV	1	1	2	1	0	0	0	6	1	5	1
527	1	56	3	4	2	0	IV	1	1	2	0	0	0	0	127	1	127	0
530	1	42	3	4	2	0	IV	1	1	2	0	0	1	1	14	1	9	1
531	2	52	3	4	2	0	IV	1	1	2	1	0	0	0	11	1	6	1
532	1	56	2	4	2	0	IV	1	1	2	0	0	0	0	3	1	3	0
533	1	55	3	4	2	0	IV	1	1	2	1	0	1	0	9	1	7	1
536	1	51	3	4	2	0	IV	1	1	2	1	0	0	0	14	1	8	1
537	1	51	2	1	0	0	I	1	1		1	1	0	0	122	1	0	1
538	1	59	3	4	2	0	IV	1	1	2	1	0	1	0	3	1	3	1
542	2	51	3	2	1	0	III	1	1	1	0	0	0	0	148	0	148	0
551	1	60	1	3	0	0	III	1	1	1	0	0	0	1	70	0	5	1
592	2	47	2	1	0	0	I	1	1	1	1	0	0	0	34	1	33	1
593	1	64	2	4	2	0	IV	1	1	2	1	0	0	0	21	1	14	1
601	1	56	2	4	2	0	IV	1	2	2	1	0	1	0	38	1	7	1
649	1	50	1	4	3	0	IV	1	1	2	1	0	1	0	6	1	6	1
651	1	38	3	4	2	0	IV	1	1	2	0	0	0	1	5	1	5	1
661	1	63	1	2	2	0	IV	2	1	1	0	1	0	0	135	0	67	1
666	2	55	3	3	1	0	III	1	1	1	0	1	1	1	20	1	0	1
670	1	57	2	1	0	0	I	1	1		0	1	0	0	142	0	0	1
671	1	73	1	3	2	0	IV	0	1	1	0	0	0	0	98	0	98	0
672	2	49	1	3	2	0	IV	1	1	1	0	0	0	1	51	1	51	1
678	1	67	3	4	0	0	IV	1	1	2	0	1	0	0	32	1	24	1
679	1	65	2	4	2	0	IV	1	1	2	1	0	0	0	28	1	3	1
682	1	49	1	4	2	0	IV	1	1	2	1	0	1	0	5	1	4	1
685	2	47	2	4	2	0	IV	1	2	2	1	0	0	0	35	1	13	1
690	1	65	1	3	0	0	III	1	1	1	0	1	0	0	20	1	0	1
693	1	65	1	2	0	0	II	1	2	1	0	1	0	1	33	1	13	1
694	2	50	3	4	0	0	IV	1	1	1	0	0	0	0	25	0	25	0
695	1	49	3	1	2	0	IV	1	1	1	1	1	1	0	9	1	0	1
707	1	71	1	4	2	0	IV	1	1	2	0	0	0	0	68	0	68	0
719	1	57	1	3	2	0	IV	2	1	1	0	0	0	0	135	0	135	0
720	1	46	3	4	2	0	IV	1	2	2	0	1	0	0	4	1	0	1
723	2	43	3	4	2	1	IV	1	1	2	1	0	1	1	8	1	1	1
725	1	56	3	1	2	0	IV	1	1	1	0	0	0	0	127	0	127	0
751	1	55	2	4	2	0	IV	1	1	2	0	1	0	0	121	0	79	1
753	1	64	1	2	0	1	IV	2	1	2	0	0	1	0	8	1	4	1
761	1	65	1	4	2	0	IV	1	1	2	0	1	0	1	6	1	4	1
764	1	60	1	2	0	0	II	1	1	1	0	0	0	0	121	0	121	0
765	1	46	3	1	0	0	I	1	2	1	1	1	1	0	130	0	95	1

ID ¹	Gender ²	Age	OPSCC subsite ³	T	N	M	Clinical Stage	Tobacco ⁴	Alcohol ⁴	Firstline Therapy ⁵	Recurrence ⁶	Secondary Carcinoma ⁶	Lymphnode Metastasis ⁶	Distant Metastasis ⁶	OS (months)	OS status ⁶	PFS (months)	PFS status ⁶
770	1	53	3	2	0	0	II	1	1	2	0	1	0	0	5	1	0	1
773	1	68	1	2	1	0	III	1	1	1	1	0	0	1	23	1	17	1
774	1	62	3	2	2	0	IV	1	1	2	0	1	0	0	9	1	0	1
781	1	68	3	4	2	0	IV	2	1	1	1	0	1	1	30	1	14	1
782	1	59	3	4	2	0	IV	1	1	2	0	1	0	0	61	1	57	1
789	2	61	2	4	2	0	IV	1	0	2	1	0	0	0	32	1	5	1
821	1	65	1	4	2	0	IV	1	1	2	0	0	0	0	121	0	121	0
848	1	66	2	4	2	0	IV	1	1	2	1	1	0	0	6	0	0	1
854	2	57	1	2	1	0	III	1	2	1	0	0	0	0	124	0	124	0
858	1	49	2	4	2	0	IV	1	1	2	1	0	1	0	25	1	9	1
879	1	64	1	2	2	0	IV	1	1	1	0	0	0	0	113	0	113	0
886	2	63	3	4	2	0	IV	1	1	2	0	0	0	0	18	1	18	0
893	1	64	1	1	2	0	IV	1	1		0	0	1	0	38	1	1	1
900	1	49	3	4	2	0	IV	1	2	2	1	0	1	0	13	1	5	1
924	1	44	1	2	2	0	IV	2	2	1	1	0	0	1	22	1	10	1
927	1	59	2	3	1	0	III	1	2	1	1	0	1	1	21	1	3	1
929	1	43	3	4	3	0	IV	1	1	2	0	0	0	1	54	1	37	1
935	2	47	3	2	0	0	II	1	1	1	0	0	0	0	81	0	81	0
937	1	60	1	2	2	0	IV	1	1	1	1	0	0	1	12	1	6	1
938	1	61	2	2	2	0	IV	0	0	1	0	0	0	0	116	0	116	0
984	2	66	1	2	3	0	IV	2	1	1	0	0	0	0	85	0	85	0
990	2	50	2	4	2	0	IV	1	1	2	0	0	0	0	1	1	1	0
993	2	51	1	2	2	0	IV	0	1	1	0	0	0	0	109	0	109	0
994	1	64	1	4	0	0	IV	1	1	1	0	1	0	0	103	0	23	1
1003	1	48	1	4	2	0	IV	1	1	2	0	0	1	1	11	1	8	1
1007	2	57	2	4	2	1	IV	0	1	2	0	0	0	1	16	1	5	1
1009	1	60	1	4	2	0	IV	1	1	2	0	0	0	0	60	0	60	0
1012	1	63	3	2	0	0	II	1	1	1	1	0	1	0	35	1	14	1
1013	1	64	1	2	1	0	III	1	1	1	0	1	0	0	50	1	47	1
1016	2	49	3	4	2	0	IV	1	1	2	0	0	0	0	5	1	5	0
1019	1	57	3	2	3	1	IV	1	1	1	0	0	0	0	3	1	3	0
1025	1	63	1	2	1	0	III	1	1	1	0	0	0	1	15	0	15	1
1026	1	79	3	4	0	1	IV	1	1	2	0	0	0	0	17	1	17	0
1027	2	42	1	1	0	0	I	1	1	1	0	0	0	0	107	0	107	0
1029	2	66	1	2	0	0	II	1	1	2	1	0	0	0	29	1	22	1
1038	1	61	3	4	2	0	IV	1	1	2	0	0	0	0	106	0	106	0
1039	1	45	2	4	2	0	IV	1	1	2	1	0	0	1	19	1	12	1
1051	1	44	3	4	2	0	IV	1	1	1	1	1	0	1	49	1	44	1
1058	2	48	2	2	0	0	II	1	1	1	0	0	0	0	103	0	103	0
1073	1	56	1	4	3	0	IV	1	1	2	1	0	1	0	10	1	6	1
1077	1	49	1	3	2	0	IV	2	1	1	0	0	0	0	98	0	98	0
1081	1	68	2	3	2		IV	1	1	2	0	1	0	0	53	1	18	1
1082	1	58	3	4	2	0	IV	1	1	2	1	0	0	0	8	1	5	1
1084	1	51	1	1	1	0	III	1	1	1	0	0	0	0	86	0	86	0
1094	1	61	2	2	0	0	II	2	1	1	0	0	0	0	105	0	105	0

ID ¹	Gender ²	Age	OPSCC subsite ³			T	N	M	Clinical Stage	Tobacco ⁴	Alcohol ⁴	Firstline Therapy ⁵	Recurrence ⁶	Secondary Carcinoma ⁶	Lymphnode Metastasis ⁵	Distant Metastasis ⁵	OS (months)	OS status ⁶	PFS (months)	PFS status ⁶
1097	2	74	3	1	2	0			IV	1	1	1	1	1	0	0	11	1	0	1
1109	1	65	3	1	1	0			III	1	1	1	1	0	1	1	99	0	4	1
1110	1	64	2	4	2	0			IV	1	1	1	1	0	0	0	38	1	11	1
1163	1	48	1	4	2	0			IV	1	1	2	1	0	0	0	19	1	15	1
1167	1	50	1	2	1	0			III	1	1	1	0	0	0	0	10	0	10	0
1191	1	43	3	4	3	0			IV	1	1	2	1	0	0	1	16	1	2	1
1195	1	47	1	2	2	0			IV	1	1	1	1	0	1	0	8	1	5	1
1199	1	51	2	2	2	0			IV	1	1	1	1	0	0	1	59	0	20	1
1200	1	54	2	4	2	1			IV	1	1	2	0	0	0	0	6	1	6	0
1201	1	63	2	2	1	0			III	2	2	1	0	0	0	0	17	1	17	0
1210	1	65	3	4	2	0			IV	1	1	1	1	0	0	0	11	1	10	1
1244	2	51	1	3	2	0			IV	1	1	2	1	0	0	0	27	1	22	1
1248	1	53	2	3	2				IV	1	1	1	0	1	0	0	28	1	0	1
1249	2	48	3	4	3	0			IV	1	1	1	0	0	1	1	18	1	6	1
1258	1	66	1	4	2				IV	2	2	1	1	0	1	0	80	0	78	1
1259	1	57	1	3	0	0			III	2	1	1	0	0	0	0	84	0	84	0
1265	1	57	1	3	1	0			III	1	1		0	0	0	0	32	1	32	0
1273	1	41	1	1	0	0			I	1	1		0	0	0	0	9	0	9	0
1279	1	84	1	4	2	1			IV	1	1		0	0	0	1	8	1	1	1
1281	2	63	2	2	2	0			IV	0	1	2	1	0	0	0	37	1	15	1
1284	1	52	1	4	2	0			IV	1	1	1	0	0	0	0	4	1	4	0
1285	1	59	1	2	0	0			II	2	1	1	0	0	0	0	65	1	65	0
1287	2	47	1							1	1		1	0	0	0	104	0	26	1
1289	1	77	1	3	2	0			IV	2	1	1	0	0	0	0	23	0	23	0
1291	1	58	2	2	1	0			III	0	1	1	0	0	0	0	71	0	71	0
1292	2	64	1	2	0	0			II	1	1	1	1	0	0	0	34	1	32	1
1296	1	69	1	2	2	0			IV	0	1	1	0	0	0	0	58	0	58	0
1297	2	59	1	3	0	0			III	1	1	1	0	0	0	0	60	0	60	0
1341	1	54	1	2	2	0			IV	1	2	1	0	0	0	0	66	0	66	0
1347	1	70	2	1	0	0			I	1	2	1	0	0	0	0	49	0	49	0
1356	2	56	1	3	0	0			III	1	1	1	1	0	0	1	46	0	20	1
1359	1	54	1	4	2	0			IV	1	0	1	0	0	0	0	47	0	47	0
1369	1	66	1	3	2	0			IV			1	0	0	0	0	0	1	1	0
1373	1	58	1	3	2	0			IV	2	0	1	1	0	0	0	21	0	8	1
1375	1	65	2	2	0	0			II			1	1	0	0	1	8	1	4	1
1376	1	48	2	3	2	0			IV	1	1	2	0	0	0	0	26	1	26	0
1380	2	44	1	2	2				IV	0	1	1	0	0	0	0	39	0	39	0
1398	2	43	3	4	2	0			IV	1	1	1	1	0	0	1	25	1	8	1
1419	1	72	3	2	1	0			III	0	1	1	1	0	0	0	9	1	9	1
1421	1	61	3	4	2	1			IV	1	1	1	0	0	0	0	3	1	3	0
1425	2	68	1	1	2	0			IV	1	1	1	0	0	0	0	31	0	31	0
1439	2	67	2	2	2	0			IV	0	0	1	1	0	0	0	9	1	8	1
1449	1	55	1	2	2	0			IV	0	1	1	0	0	0	0	27	0	27	0
1450	1	74	3	1	0	0			I	0	0	1	0	0	0	0	24	0	24	0
1455	1	49	1	4	2				IV	1	1	2	0	0	0	0	24	0	24	0

ID ¹	Gender ²	Age	OPSCC subsite ³	T	N	M	Clinical Stage	Tobacco ⁴	Alcohol ⁴	Firstline Therapy ⁵	Recurrence ⁵	Secondary Carcinoma ⁵	Lymphnode Metastasis ⁵	Distant Metastasis ⁵	OS (months)	OS status ⁵	PFS (months)	PFS status ⁵
1462	1	45	1	2	2	0	IV	1	0	1	1	0	1	1	15	1	8	1
1464	2	67	1	3	2	0	IV	1	1	1	1	0	0	0	15	0	10	1
1483	1	75	2	2	2	0	IV	1	1	1	0	0	0	0	4	1	4	0
1486	1	60	2	2	2	0	IV	0	1	2	0	0	0	0	20	0	20	0
1494	2	53	2	1	2	0	IV	1	1	1	1	0	1	0	19	1	11	1
1502	1	41	2	2	2	0	IV	1		1	1	0	0	0	29	1	13	1
1507	2	62	1	2	2	0	IV	1	2	1	0	0	0	0	22	0	22	0
1523	1	69	3	3	0	0	III	0	1	1	0	0	0	0	17	0	17	0
1524	1	72	3	1	2	0	IV	1	2	1	0	0	0	0	20	0	20	0
1529	1	66	1	3	2	0	IV	0	1	1	0	0	0	0	19	0	19	0
1533	2	56	3	2	0	0	II	1	0	1	0	0	0	0	16	0	16	0
1539	1	69	2	2	2	0	IV	1	0	1	0	0	0	0	15	0	15	0
1541	1	59	1	2	2	0	IV	1	0	1	0	0	0	0	16	0	16	0
1545	1	49	2	3	1	0	III	1	2	1	0	0	0	0	17	0	17	0
1549	1	58	1	2	1	0	III	1	0	1	0	0	0	0	17	0	17	0
1553	1	72	2	1	1	0	III	0	1	1	1	0	1	0	102	0	36	1
1559	2	57	3	1	0	0	I	1	1	1	0	0	0	0	13	0	13	0
1597	1	55	1	1	0	0	I	1	0	1	0	0	0	0	12	0	12	0
1614	2	59	1	3	1	0	III	1	1	1	0	0	0	0	11	0	11	0
1620	2	47	1	2	2	0	IV	1	2	1	0	0	0	1	11	0	4	1
1633	1	39	1	2	0	0	II	1	1	1	1	0	0	0	47	0	40	1
1639	2	62	1	2	2	0	IV	0	1	1	0	0	0	0	10	0	10	0
1641	1	85	2	3	2	0	IV	0	1	1	0	0	0	0	10	0	10	0
1643	2	54	3	4	2	0	IV	0	1	1	0	0	0	0	2	0	2	0
1650	1	62	1	3	2	0	IV	1	1	1	0	0	0	0	9	0	9	0
1652	1	60	1	2	2	0	IV	1	1	2	0	0	0	0	6	0	6	0
1654	2	61	2	2	2	0	IV	1	1	1	0	0	0	0	5	0	5	0
1658	1	58	3					1	1	1	1	0	0	0	17	0	7	1
1667	2	62	1	3	0	0	III	1	1		0	0	0	0	1	0	1	0

ID ¹	DNA group ⁷	VL group qPCR ⁸	RNA group ⁹	CxCa RNA pattern ¹⁰	HPVtransf group ¹¹	HPV16 Copies/cell ¹²	Integration status ¹³	qE6*II ¹⁴	E6*II/ E6*II ¹⁵	(E6*II_E6*II)/ qE6*II ¹⁶	Copy# E*II/E6*II ¹⁷	qE1C ¹⁸	E1C ¹⁹	E1C/qE1C ²⁰	Copy# E1C ²¹
5	0	0	na	na	0		na	na	na	na	na	na	na	na	na
44	0	0	na	na	0		na	na	na	na	na	na	na	na	na
47	1	1	1	na	1	3,5848E-02	na	na	na	na	na	na	na	na	na
54	0	0	na	na	0		na	na	na	na	na	na	na	na	na
63	1	2	2	2	2	1,9675E+01	2	167	2984	17,92	5	3963	2845	0,718	4
65	1	1	2	2	2	1,2597E-03	1	2804	129	0,05	1	3741	0	0,001	0
83	0	0	na	na	0		na	na	na	na	na	na	na	na	na
84	0	0	na	na	0		na	na	na	na	na	na	na	na	na
89	1	1	1	na	1	1,4629E-03	na	na	na	na	na	na	na	na	na
91	1	1	2	2	2	1,5132E-03	1	2136	86	0,04	0	3878	1	0,001	0
95	1	2	2	1	2	1,3419E+01	3	2787	704	0,25	1	3869	0	0,001	0
114	1	2	2	2	2	6,3142E+01	2	26	2821	108,48	7	3390	3137	0,925	4
117	1	1	na	na	na	8,7726E-03	na	na	na	na	na	na	na	na	na
122	1	1	2	2	2	2,5309E-03	1	2535	440	0,17	1	4231	0	0,001	0
124	1	2	2	2	2	3,3316E+01	2	182	2755	15,14	5	3626	2631	0,726	4
146	0	0	na	na	0		na	na	na	na	na	na	na	na	na
167	0	0	na	na	0		na	na	na	na	na	na	na	na	na
185	1	2	2	2	2	1,4168E+01	2	156	2392	15,33	5	3893	3264	0,839	4
200	0	0	na	na	0		na	na	na	na	na	na	na	na	na
217	0	0	na	na	0		na	na	na	na	na	na	na	na	na
266	0	0	na	na	0		na	na	na	na	na	na	na	na	na
270	0	0	na	na	0		na	na	na	na	na	na	na	na	na
289	0	0	na	na	0		na	na	na	na	na	na	na	na	na
294	1	1	1	na	1	1,0405E-03	na	na	na	na	na	na	na	na	na
329	1	2	2	2	2	7,8711E-01	1	848	3445	4,06	4	3910	654	0,167	1
339	1	2	2	2	2	2,8732E+01	2	24	2335	97,29	6	3647	3223	0,884	4
345	0	0	na	na	0		na	na	na	na	na	na	na	na	na
349	0	0	na	na	0		na	na	na	na	na	na	na	na	na
350	0	0	na	na	0		na	na	na	na	na	na	na	na	na
386	0	0	na	na	0		na	na	na	na	na	na	na	na	na
391	0	0	na	na	0		na	na	na	na	na	na	na	na	na
426	0	0	na	na	0		na	na	na	na	na	na	na	na	na

ID ¹	DNA group ⁷	VL group qPCR ⁸	RNA group ⁹	Cx/Ca RNA pattern ¹⁰	HPVtransf group ¹¹	HPV16 Copies/cell ¹²	Integration status ¹³	qE6*II ¹⁴	E6*II/ E6* ¹⁵	(E6*II_E6*I)/ qE6*II ¹⁶	Copy# E*I/II/E6*I ¹⁷	qE1C ¹⁸	E1C ¹⁹	E1C/qE1C ²⁰	Copy# E1C ²¹
471	0	0	na	na	0		na	na	na	na	na	na	na	na	na
473	0	0	na	na	0		na	na	na	na	na	na	na	na	na
480	0	0	na	na	0		na	na	na	na	na	na	na	na	na
481	1	1	1	na	1	3,7487E-03	na	na	na	na	na	na	na	na	na
492	1	1	1	na	1	7,1491E-04	na	na	na	na	na	na	na	na	na
494	0	0	na	na	0		na	na	na	na	na	na	na	na	na
526	0	0	na	na	0		na	na	na	na	na	na	na	na	na
527	0	0	na	na	0		na	na	na	na	na	na	na	na	na
530	0	0	na	na	0		na	na	na	na	na	na	na	na	na
531	0	0	na	na	0		na	na	na	na	na	na	na	na	na
532	0	0	na	na	0		na	na	na	na	na	na	na	na	na
533	0	0	na	na	0		na	na	na	na	na	na	na	na	na
536	0	0	na	na	0		na	na	na	na	na	na	na	na	na
537	0	0	na	na	0		na	na	na	na	na	na	na	na	na
538	0	0	na	na	0		na	na	na	na	na	na	na	na	na
542	1	1	1	na	1	2,0280E-04	na	na	na	na	na	na	na	na	na
551	0	0	na	na	0		na	na	na	na	na	na	na	na	na
592	0	0	na	na	0		na	na	na	na	na	na	na	na	na
593	0	0	na	na	0		na	na	na	na	na	na	na	na	na
601	0	0	na	na	0		na	na	na	na	na	na	na	na	na
649	0	0	na	na	0		na	na	na	na	na	na	na	na	na
651	0	0	na	na	0		na	na	na	na	na	na	na	na	na
661	1	2	2	2	2	5,4619E+00	1	1	2398	2398,00	7	3858	0	0,001	0
666	0	0	na	na	0		na	na	na	na	na	na	na	na	na
670	1	2	2	2	2	3,1800E+02	2	33	2699	81,79	7	4262	2955	0,693	4
671	1	2	2	2	2	9,9627E-01	2	642	2616	4,07	4	3972	2334	0,588	3
672	1	1	1	na	1	1,1823E-03	na	na	na	na	na	na	na	na	na
678	1	1	2	1	1	4,6626E-03	3	2240	129	0,06	2	4000	0	0,001	0
679	1	1	2	2	2	3,2794E-03	1	2413	247	0,10	2	4121	2	0,001	0
682	1	1	1	na	1	2,7199E-03	na	na	na	na	na	na	na	na	na
685	1	1	1	na	1		na	na	na	na	na	na	na	na	na
690	1	1	1	na	1	5,3917E-04	na	na	na	na	na	na	na	na	na
693	0	0	na	na	0		na	na	na	na	na	na	na	na	na
694	1	2	2	2	2	4,9017E+00	2	188	1958	10,41	5	4032	2830	0,702	4
695	1	1	1	na	1	1,5325E-04	na	na	na	na	na	na	na	na	na
707	0	0	na	na	0		na	na	na	na	na	na	na	na	na
719	1	1	1	na	1		na	na	na	na	na	na	na	na	na
720	0	0	na	na	0		na	na	na	na	na	na	na	na	na
723	1	1	1	na	1	2,0841E-03	na	na	na	na	na	na	na	na	na
725	0	0	na	na	0		na	na	na	na	na	na	na	na	na
751	0	0	na	na	0		na	na	na	na	na	na	na	na	na
753	0	0	na	na	0		na	na	na	na	na	na	na	na	na
761	0	0	na	na	0		na	na	na	na	na	na	na	na	na
764	0	0	na	na	0		na	na	na	na	na	na	na	na	na
765	0	0	na	na	0		na	na	na	na	na	na	na	na	na

ID ¹	DNA group ⁷	VL group qPCR ⁸	RNA group ⁹	Cx/Ca RNA pattern ¹⁰	HPV/transf group ¹¹	HPV16 Copies/cell ¹²	Integration status ¹³	qE6*II ¹⁴	E6*II/ E6* ¹⁵	(E6*II_E6*II)/ qE6*II ¹⁶	Copy# E*II/E6* ¹⁷	qE1C ¹⁸	E1C ¹⁹	E1C/qE1C ²⁰	Copy# E1C ²¹
770	1	1	1	na	1	3,5075E-03	na	na	na	na	na	na	na	na	na
773	0	0	na	na	0		na	na	na	na	na	na	na	na	na
774	0	0	na	na	0		na	na	na	na	na	na	na	na	na
781	0	0	na	na	0		na	na	na	na	na	na	na	na	na
782	1	1	1	na	1	5,4394E-04	na	na	na	na	na	na	na	na	na
789	0	0	na	na	0		na	na	na	na	na	na	na	na	na
821	1	1	1	na	1	6,9313E-04	na	na	na	na	na	na	na	na	na
848	0	0	na	na	0		na	na	na	na	na	na	na	na	na
854	0	0	na	na	0		na	na	na	na	na	na	na	na	na
858	0	0	na	na	0		na	na	na	na	na	na	na	na	na
879	0	0	na	na	0		na	na	na	na	na	na	na	na	na
886	0	0	na	na	0		na	na	na	na	na	na	na	na	na
893	0	0	na	na	0		na	na	na	na	na	na	na	na	na
900	0	0	na	na	0		na	na	na	na	na	na	na	na	na
924	1	1	1	na	1	4,4146E-03	na	na	na	na	na	na	na	na	na
927	0	0	na	na	0		na	na	na	na	na	na	na	na	na
929	1	1	1	na	1		na	na	na	na	na	na	na	na	na
935	0	0	na	na	0		na	na	na	na	na	na	na	na	na
937	0	0	na	na	0		na	na	na	na	na	na	na	na	na
938	0	0	na	na	0		na	na	na	na	na	na	na	na	na
984	1	2	2	2	2	7,1451E-01	1	27	1754	64,96	7	4311	1713	0,397	2
990	0	0	na	na	0		na	na	na	na	na	na	na	na	na
993	1	2	2	2	2	2,2790E+01	2	21	124	5,90	5	3661	3043	0,831	4
994	1	1	1	na	1		na	na	na	na	na	na	na	na	na
1003	0	0	na	na	0		na	na	na	na	na	na	na	na	na
1007	0	0	na	na	0		na	na	na	na	na	na	na	na	na
1009	0	0	na	na	0		na	na	na	na	na	na	na	na	na
1012	1	1	1	na	1	5,1419E-03	na	na	na	na	na	na	na	na	na
1013	0	0	na	na	0		na	na	na	na	na	na	na	na	na
1016	1	1	1	na	1		na	na	na	na	na	na	na	na	na
1019	0	0	na	na	0		na	na	na	na	na	na	na	na	na
1025	0	0	na	na	0		na	na	na	na	na	na	na	na	na
1026	0	0	na	na	0		na	na	na	na	na	na	na	na	na
1027	0	0	na	na	0		na	na	na	na	na	na	na	na	na
1029	1	1	1	na	1	8,7109E-04	na	na	na	na	na	na	na	na	na
1038	1	1	1	na	1	4,4704E-03	na	na	na	na	na	na	na	na	na
1039	0	0	na	na	0		na	na	na	na	na	na	na	na	na
1051	1	1	2	1	1	1,8157E-02	3	2297	366	0,16	1	3630	1	0,001	0
1058	0	0	na	na	0		na	na	na	na	na	na	na	na	na
1073	1	1	1	na	1		na	na	na	na	na	na	na	na	na
1077	0	0	na	na	0		na	na	na	na	na	na	na	na	na
1081	1	1	2	2	2	7,3573E-03	1	1500	96	0,06	1	4157	1	0,001	0
1082	0	0	na	na	0		na	na	na	na	na	na	na	na	na
1084	0	0	na	na	0		na	na	na	na	na	na	na	na	na
1094	0	0	na	na	0		na	na	na	na	na	na	na	na	na

ID ¹	DNA group ⁷	VL group qPCR ⁸	RNA group ⁹	Cx/Ca RNA pattern ¹⁰	HPV/transf group ¹¹	HPV16 Copies/cell ¹²	Integration status ¹³	qE6*II ¹⁴	E6*II/ E6* ¹⁵	(E6*II_E6* ¹⁶)/ qE6*II ¹⁵	Copy# E*II/E6* ¹⁷	qE1C ¹⁸	E1C ¹⁹	E1C/qE1C ²⁰	Copy# E1C ²¹
1097	0	0	na	na	0		na	na	na	na	na	na	na	na	na
1109	1	1	1	na	1	1,3793E-02	na	na	na	na	na	na	na	na	na
1110	0	0	na	na	0		na	na	na	na	na	na	na	na	na
1163	1	2	2	2	2	3,7676E+00	2	172	1920	11,16	5	3230	2859	0,885	4
1167	0	0	na	na	0		na	na	na	na	na	na	na	na	na
1191	0	0	na	na	0		na	na	na	na	na	na	na	na	na
1195	1	1	1	na	1	3,1776E-04	na	na	na	na	na	na	na	na	na
1199	1	1	1	na	1	2,8482E-04	na	na	na	na	na	na	na	na	na
1200	1	1	1	na	1	1,4573E-03	na	na	na	na	na	na	na	na	na
1201	0	0	na	na	0		na	na	na	na	na	na	na	na	na
1210	1	1	1	na	1	3,3083E-04	na	na	na	na	na	na	na	na	na
1244	1	1	1	na	1	1,0480E-01	na	na	na	na	na	na	na	na	na
1248	1	1	1	na	1	2,2134E-04	na	na	na	na	na	na	na	na	na
1249	0	0	na	na	0		na	na	na	na	na	na	na	na	na
1258	1	1	1	na	1	1,0398E-03	na	na	na	na	na	na	na	na	na
1259	1	1	1	na	1	5,1261E-04	na	na	na	na	na	na	na	na	na
1265	1	1	2	1	1		3	1543	128	0,08	0	4109	0	0,001	0
1273	1	1	2	1	1	1,5059E-03	3	1494	402	0,27	1	3880	1	0,001	0
1279	1	1	1	na	1	6,9187E-04	na	na	na	na	na	na	na	na	na
1281	1	2	2	2	2	1,4579E+01	2	4	1583	395,75	7	3219	2955	0,918	4
1284	1	1	2	1	1	3,0624E-02	3	1432	270	0,19	0	3817	1	0,001	0
1285	1	1	2	1	1	3,3069E-03	3	1384	79	0,06	0	4056	0	0,001	0
1287	1	2	2	2	2	8,8894E-01	1	669	1813	2,71	4	3776	0	0,001	0
1289	1	2	1	na	2	8,1488E-01	na	na	na	na	na	na	na	na	na
1291	1	2	2	2	2	1,5447E+02	2	49	2380	48,57	5	1307	426	0,326	2
1292	1	1	1	na	1	7,6612E-03	na	na	na	na	na	na	na	na	na
1296	1	2	2	2	2	5,5428E+01	2	263	2348	8,93	4	1963	2686	1,369	5
1297	1	1	1	na	1		na	na	na	na	na	na	na	na	na
1341	1	1	2	2	2	4,7939E-04	1	2062	997	0,48	2	3769	1	0,001	0
1347	0	0	na	na	0		na	na	na	na	na	na	na	na	na
1356	1	1	1	na	1		na	na	na	na	na	na	na	na	na
1359	0	0	na	na	0		na	na	na	na	na	na	na	na	na
1369	1	2	2	2	2	8,3238E+01	2	16	1797	112,31	7	3859	2995	0,776	4
1373	0	0	na	na	0		na	na	na	na	na	na	na	na	na
1375	0	0	na	na	0		na	na	na	na	na	na	na	na	na
1376	0	0	na	na	0		na	na	na	na	na	na	na	na	na
1380	1	2	2	2	2	2,5212E+02	2	4	1768	505,00	7	2925	3024	1,034	4
1398	0	0	na	na	0		na	na	na	na	na	na	na	na	na
1419	0	0	na	na	0		na	na	na	na	na	na	na	na	na
1421	1	1	1	na	1		na	na	na	na	na	na	na	na	na
1425	1	2	2	2	2	4,9539E+01	2	766	2459	3,21	4	3750	978	0,261	2
1439	0	0	na	na	0		na	na	na	na	na	na	na	na	na
1449	1	2	2	2	2	1,9518E+01	2	34	2443	71,85	7	3196	2797	0,875	4
1450	0	0	na	na	0		na	na	na	na	na	na	na	na	na
1455	1	1	1	na	1	7,2163E-03	na	na	na	na	na	na	na	na	na

ID ¹	DNA group ⁷	VL group qPCR ⁸	RNA group ⁹	Cx/Ca RNA pattern ¹⁰	HPVtransf group ¹¹	HPV16 Copies/cell ¹²	Integration status ¹³	qE6*II ¹⁴	E6*II/E6* ¹⁵	(E6*II_E6*)/qE6*II ¹⁶	Copy# E*II/E6* ¹⁷	qE1C ¹⁸	E1C ¹⁹	E1C/qE1C ²⁰	Copy# E1C ²¹
1462	0	0	na	na	0		na	na	na	na	na	na	na	na	na
1464	1	2	2	2	2	8,9127E+01	2	332	1997	6,02	5	2992	1	0,001	0
1483	1	2	2	2	2	1,4188E+00	2	12	2344	195,29	7	3260	2675	0,821	4
1486	1	2	2	2	2	6,8573E+00	2	44	1739	39,52	6	3939	2863	0,727	4
1494	1	1	1	na	1	3,2162E-03	na	na	na	na	na	na	na	na	na
1502	1	1	1	na	1		na	na	na	na	na	na	na	na	na
1507	0	0	na	na	0		na	na	na	na	na	na	na	na	na
1523	1	1	2	2	2	1,2717E-02	1	2587	137	0,05	1	4057	2	0,001	0
1524	0	0	na	na	0		na	na	na	na	na	na	na	na	na
1529	1	2	2	2	2	7,3190E+01	2	24	2443	101,79	7	4055	3032	0,748	4
1533	0	0	na	na	0		na	na	na	na	na	na	na	na	na
1539	1	2	2	2	2	3,4759E+01	2	20	2451	122,55	7	3534	3215	0,910	4
1541	1	2	2	2	2	1,7327E+02	2	369	2612	7,09	5	3796	2712	0,714	4
1545	1	1	1	na	1	3,0232E-03	na	na	na	na	na	na	na	na	na
1549	1	1	1	na	1	4,7602E-03	na	na	na	na	na	na	na	na	na
1553	1	1	2	2	2	2,3025E-01	1	96	2642	27,52	6	3819	382	0,100	1
1559	1	1	1	na	1	2,9966E-03	na	na	na	na	na	na	na	na	na
1597	1	1	1	na	1	2,3849E-03	na	na	na	na	na	na	na	na	na
1614	1	1	1	na	1	6,1591E-03	na	na	na	na	na	na	na	na	na
1620	0	0	na	na	0		na	na	na	na	na	na	na	na	na
1633	1	1	2	1	1	3,1524E-02	3	2802	1976	0,71	3	3163	1	0,001	0
1639	1	2	2	2	2	1,5326E+01	2	26	2520	98,82	7	3547	2827	0,797	4
1641	1	2	2	2	2	1,4359E+01	2	27	2499	92,56	7	3687	2761	0,749	4
1643	1	1	2	2	2	4,2102E-01	1	702	2568	3,66	5	3910	0	0,001	0
1650	1	2	2	2	2	2,5312E+00	1	327	2570	7,87	5	4045	1	0,001	0
1652	1	1	1	na	1	6,2728E-04	na	na	na	na	na	na	na	na	na
1654	1	2	2	2	2	4,4176E+00	1	2038	2565	1,26	4	3851	1	0,001	0
1658	0	0	na	na	0		na	na	na	na	na	na	na	na	na
1667	0	0	na	na	0		na	na	na	na	na	na	na	na	na

ID ¹	qE1^E4 ²²	E1^E4 ²³	E1^E4/ qE1^E4 ²⁴	Copy# E1^E4 ²⁵	qL1 ²⁶	L1 ²⁷	L1/qL1 ²⁸	Copy# L1 ²⁹	E6*II or E6*I vs E1^E4 ³⁰	E1C vs L1 ³¹	CxCa RNA pattern ¹⁰	p16 ³²	pRb ³²	CyD1 ³²	p53 ³²
5	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	1	2	1	2
44	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	1	2	1	1
47	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	1	2	2	2
54	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	1	2	1	0
63	9	2908	323,111	7	147	140	0,949	2	0,06	0,76	2	2	1	1	1
65	1094	0	0,001	0	221	2	0,001	0	46,01	0,00	2	2	1	1	1
83	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	1	2	2	2
84	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na
89	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	1	2	1	2
91	903	0	0,001	0	202	3	0,001	0	40,03	0,00	2	1	2	1	2
95	647	1001	1,548	3	150	0	0,001	0	0,16	0,00	1	2	1	1	0
114	1	2938	2937,500	7	180	1446	8,033	3	0,04	0,12	2	2	1	1	1
117	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	1	2	1	2
122	831	0	0,001	0	114	3	0,001	0	173,60	0,00	2	1	2	1	0
124	1	2962	2962,000	7	93	607	6,522	3	0,01	0,11	2	2	1	1	1
146	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	1	1	2	2
167	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	1	2	1	2
185	4	2898	724,375	7	230	513	2,230	2	0,02	0,38	2	1	1	1	2
200	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	1	2	2	2
217	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	1	2	2	1
266	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na
270	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	1	2	2	2
289	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	2	na	0
294	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	1	2	2	2
329	804	1301	1,619	3	214	30	0,140	1	2,51	1,19	2	1	1	1	1
339	1	3146	3146,000	7	312	13	0,042	0	0,03	21,18	2	2	1	1	0
345	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	1	2	2	2
349	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	2	na	0
350	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	1	2	2	0
386	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	1	2	2	2
391	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	2	2	2	2
426	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	1	2	na	2

ID ¹	qE1^E4 ²²	E1^E4 ²³	E1^E4/ qE1^E4 ²⁴	Copy# E1^E4 ²⁵	qL1 ²⁶	L1 ²⁷	L1/qL1 ²⁸	Copy# L1 ²⁹	E6^II or E6^I vs E1^E4 ³⁰	E1C vs L1 ³¹	CxCa RNA pattern ¹⁰	p16 ³²	pRb ³²	CyD1 ³²	p53 ³²
471	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	1	2	2	2
473	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	1	2	1	0
480	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	2	1	0
481	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	1	2	2	2
492	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	1	1	1	2
494	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	1	2	2	0
526	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	1	2	1	0
527	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	1	2	na	2
530	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	1	2	2	2
531	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	2	2	2	2
532	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	2
533	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	1	2	2	2
536	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	1	2	2	2
537	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na
538	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	1	2	2	1
542	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	1	2	2	2
551	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	1	2	2	2
592	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	1	2	1	1
593	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	1	2	1	0
601	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	1	2	1	1
649	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	1	2	na	0
651	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	1	2	1	0
661	121	0	0,001	0	91	2	0,001	0	2398000,00	0,00	2	2	1	1	1
666	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	2	2	2	2
670	1	2942	2942,000	7	70	1370	19,571	4	0,03	0,04	2	2	1	1	1
671	41	2973	72,512	5	152	60	0,391	2	0,06	1,50	2	2	1	1	2
672	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	1	1	1	2
678	603	60	0,100	2	166	2	0,001	0	0,58	0,00	1	1	2	1	0
679	1351	0	0,001	0	164	1	0,001	0	102,38	0,00	2	1	2	2	0
682	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	1	2	2	2
685	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	1	2	2	1
690	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	1	2	2	1
693	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	1	2	1	2
694	12	3133	261,083	7	235	403	1,716	2	0,04	0,41	2	2	1	1	1
695	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	2	2	na	2
707	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	1	2	2	2
719	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	1	2	1	2
720	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	1	2	1	1
723	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	1	2	2	1
725	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	1	2	2	2
751	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na
753	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	1	2	1	0
761	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	1	2	1	1
764	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	1	2	2	2
765	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	1	2	1	0

ID ¹	qE1^E4 ²²	E1^E4 ²³	E1^E4/ qE1^E4 ²⁴	Copy# E1^E4 ²⁵	qL1 ²⁶	L1 ²⁷	L1/qL1 ²⁸	Copy# L1 ²⁹	E6*II or E6*I vs E1^E4 ³⁰	E1C vs L1 ³¹	CxCa RNA pattern ¹⁰	p16 ³²	pRb ³²	CyD1 ³²	p53 ³²
770	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	2	2	1	2
773	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	1	2	2	1
774	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	2	1	1	2
781	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	1	1	2	0
782	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	1	2	2	2
789	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	1	2	2	0
821	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	1	2	2	2
848	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	1	2	2	1
854	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	2	2	1	1
858	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	1	2	2	2
879	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	1	2	1	2
886	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	1	2	2	0
893	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	1	2	2	2
900	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	1	2	1	0
924	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	2	2	2	2
927	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	1	2	1	2
929	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	2	1	1	0
935	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	1	2	1	0
937	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	2	2	2	2
938	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	2	1	1	1
984	829	0	0,001	0	313	3	0,001	0	64962,96	397,40	2	2	1	1	1
990	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	1	1	1	0
993	1	2911	2910,500	7	42	1724	41,048	4	0,00	0,02	2	2	1	1	1
994	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	1	2	2	2
1003	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	1	2	2	2
1007	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	1	2	1	na
1009	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	1	2	2	2
1012	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	1	2	2	2
1013	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	1	2	2	0
1016	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	1	2	1	2
1019	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	1	2	2	0
1025	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	1	2	2	0
1026	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na
1027	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na
1029	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	1	na	na
1038	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	1	2	na	na
1039	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	1	1	1
1051	321	499	1,555	3	133	1	0,001	0	0,10	0,00	1	1	1	2	1
1058	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	1	2	2	2
1073	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na
1077	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	2	1	1	2
1081	1437	0	0,001	0	137	2	0,001	0	64,00	0,00	2	na	2	2	2
1082	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na
1084	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	2	2	0
1094	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	2	1	1	1

ID ¹	qE1^E4 ²²	E1^E4 ²³	E1^E4/ qE1^E4 ²⁴	Copy# E1^E4 ²⁵	qL1 ²⁶	L1 ²⁷	L1/qL1 ²⁸	Copy# L1 ²⁹	E6*II or E6*I vs E1^E4 ³⁰	E1C vs L1 ³¹	CxCa RNA pattern ¹⁰	p16 ³²	pRb ³²	CyD1 ³²	p53 ³²
1097	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	1	na	1
1109	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	2	2	2	2
1110	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	1	2	1	0
1163	36	1684	47,423	5	115	402	3,511	3	0,24	0,25	2	2	1	1	1
1167	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	1	2	1	2
1191	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	1	2	1	2
1195	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	1	2	2	2
1199	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	1	2	2	2
1200	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	1	2	2	2
1201	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	1	1	1	2
1210	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	1	2	1	0
1244	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	1	2	2	0
1248	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	1	2	1	0
1249	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	1	2	2	0
1258	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	1	2	1	0
1259	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	1	2	2	2
1265	882	222	0,252	2	143	1	0,001	0	0,33	0,00	1	na	1	2	0
1273	623	305	0,489	2	118	2	0,001	0	0,55	0,00	1	na	2	1	1
1279	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	2	2	1	2
1281	1	2753	2752,500	7	46	1414	30,739	4	0,14	0,03	2	2	1	1	1
1284	910	370	0,407	2	150	1	0,001	0	0,46	0,00	1	2	2	1	1
1285	1259	575	0,457	2	140	1	0,001	0	0,13	0,00	1	1	2	2	2
1287	1843	0	0,001	0	267	1	0,001	0	2710,01	0,00	2	2	1	1	1
1289	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	1	2	2	0
1291	1	2170	2170,000	7	18	1160	64,444	4	0,02	0,01	2	2	1	1	1
1292	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	1	2	2	2
1296	5	1555	310,900	7	24	821	34,208	4	0,03	0,04	2	2	1	1	1
1297	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	1	2	2	1
1341	617	0	0,001	0	217	3	0,001	0	483,51	0,00	2	1	2	1	0
1347	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	2	2	2	1
1356	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	1	2	1	2
1359	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	1	2	2	2
1369	1	3008	3008,000	7	124	1255	10,121	3	0,04	0,08	2	2	1	1	1
1373	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	2	2	2	2
1375	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	1	2	1	1
1376	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	1	2	2	na
1380	1	2972	2972,000	7	79	1444	18,395	4	0,17	0,06	2	1	1	1	1
1398	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	1	2	2	0
1419	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	1	2	2	2
1421	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	1	2	2	2
1425	19	2634	142,378	6	95	361	3,800	3	0,02	0,07	2	2	1	1	1
1439	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	1	2	1	1
1449	5	1404	280,700	7	22	953	44,326	4	0,26	0,02	2	2	1	1	1
1450	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	2	2	1	0
1455	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	2	1	1	2

ID ¹	qE1^E4 ²²	E1^E4 ²³	E1^E4/ qE1^E4 ²⁴	Copy# E1^E4 ²⁵	qL1 ²⁶	L1 ²⁷	L1/qL1 ²⁸	Copy# L1 ²⁹	E6*II or E6*I vs E1^E4 ³⁰	E1C vs L1 ³¹	CxCa RNA pattern ¹⁰	p16 ³²	pRb ³²	CyD1 ³²	p53 ³²
1462	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	1	2	2	2
1464	12	2172	180,958	6	250	37	0,148	1	0,03	0,01	2	2	1	1	1
1483	1	2247	2247,000	7	169	0	0,001	0	0,09	820,55	2	2	1	1	1
1486	3	2927	975,667	7	169	1362	8,083	3	0,04	0,09	2	2	1	1	1
1494	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	1	2	1	2
1502	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	1	2	1	2
1507	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	1	2	2	2
1523	903	0	0,001	0	193	0	0,001	0	52,96	0,00	2	2	1	1	0
1524	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	1	2	2	2
1529	1	2847	2847,000	7	156	394	2,526	3	0,04	0,30	2	2	1	1	1
1533	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	1	2	1	1
1539	1	2975	2974,500	7	86	1252	14,558	4	0,04	0,06	2	2	1	1	1
1541	10	2907	290,650	7	146	271	1,856	2	0,02	0,38	2	2	1	1	1
1545	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	1	2	1	0
1549	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	1	1	1	1
1553	1102	0	0,001	0	149	3	0,001	0	27520,83	100,03	2	2	1	1	1
1559	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	1	2	2	0
1597	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	2	2	2	2
1614	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	1	2	1	2
1620	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	1	2	2	0
1633	481	2687	5,585	4	178	0	0,001	0	0,13	0,00	1	2	1	1	1
1639	1	2749	2749,000	7	43	1142	26,547	4	0,04	0,03	2	2	1	1	2
1641	1	2644	2644,000	7	146	1054	7,219	3	0,04	0,10	2	2	1	1	1
1643	886	74	0,084	1	164	0	0,001	0	43,80	0,00	2	2	1	1	1
1650	1187	0	0,001	0	157	1	0,001	0	7869,83	0,00	2	2	1	1	1
1652	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	1	2	1	2
1654	1803	0	0,001	0	110	0	0,001	0	1258,59	0,00	2	1	2	1	2
1658	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	1	2	1	2
1667	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	na	1	2	2	2

Legende Tabelle 9-1:

- ¹Patienten-Identitätsnummer (Datenbank HNO-Labor)
- ²Geschlecht: 1, männlich; 2, weiblich
- ³Oropharynx Lokalisation: 1, Tonsille; 2, Zungengrund; 3, andere
- ⁴Tabak- und Alkoholkonsum: 0, nie; 1, ja; 2, ex
- ⁵Primärtherapie: 1, Operation; 2, Radio- und/oder Chemotherapie
- ⁶Tumorfolgeereignisse (Lokalrezidiv, Lymphknoten-, Fernmetastase, Zweitkarzinom) oder Status Gesamt- (OS) und progressionsfreies Überleben (PFS): 0, Ereignis nicht eingetreten (zensiert); 1, Ereignis eingetreten
- ⁷HPV16 DNA (BSGP5+/6+-PCR/MPG): 0, HPV-negativ; 1, HPV16 DNA-positiv
- ⁸quantitative Viruslast (qPCR): 0, HPV-negativ; 1, niedrige Viruslast (<0.5 Kopien/Zelle); 2, hohe Viruslast (>0.5 Kopien/Zelle)
- ⁹HPV16 E6*II und/oder *I RNA: 1, E6*II und *I-negativ; 2, E6*II und/oder *I-positiv
- ¹⁰virale RNA-Muster: 1, ohne RNA-Muster (RNA⁺/CxCa⁻); 2, mit RNA-Muster (RNA⁺/CxCa⁺)
- ¹¹Markerkombination: hohe Viruslast und/oder virale RNA-Muster: 0, HPV-negativ; 1, HPV_{transf}⁻; 2, HPV_{transf}⁺
- ¹²Ergebnisse der quantitativen real-time PCR als HPV16 Genomkopien/Zelle
- ¹³physikalischer Status HPV16 Genom (abgeleitet von RNA-Mustern): 1, integriertes HPV16; 2, episomales HPV16; 3, OPSCC ohne RNA-Muster
- ¹⁴MFI Werte für E6*II Kalibrator-RNA (qE6*II)
- ¹⁵MFI Werte für E6*II oder E6*I (rot) Transkripte
- ¹⁶Verhältnis (MFI Werte) E6*II oder E6*I vs. qE6*II
- ¹⁷quantitative Ergebnisse für E6*II/E6*I Expression: 0, <25; 1, <250; 2, <2500; 3, <25000; 4, <25x10⁴; 5, <25x10⁵; 6, <25x10⁶; 7, >25x10⁶ Kopien
- ¹⁸MFI Werte für E1C Kalibrator-RNA (qE1C)
- ¹⁹MFI Werte für E1C Transkripte
- ²⁰Verhältnis (MFI Werte) E1C vs. qE1C
- ²¹quantitative Ergebnisse für E1C Expression: 0, <25; 1, <250; 2, <2500; 3, <25000; 4, <25x10⁴; 5, <25x10⁵; 6, <25x10⁶; 7, >25x10⁶ Kopien
- ²²MFI Werte für E1^E4 Kalibrator-RNA (qE1^E4)
- ²³MFI Werte für E1^E4 Transkripte
- ²⁴Verhältnis (MFI Werte) E1^E4 vs. qE1^E4
- ²⁵quantitative Ergebnisse für E1^E4 Expression: 0, <25; 1, <250; 2, <2500; 3, <25000; 4, <25x10⁴; 5, <25x10⁵; 6, <25x10⁶; 7, >25x10⁶ Kopien
- ²⁶MFI Werte für L1 Kalibrator-RNA (qL1)
- ²⁷MFI Werte für L1 Transkripte
- ²⁸Verhältnis (MFI Werte) L1 vs. qL1
- ²⁹quantitative Ergebnisse für L1 Expression: 0, <25; 1, <250; 2, <2500; 3, <25000; 4, <25x10⁴; 5, <25x10⁵; 6, <25x10⁶; 7, >25x10⁶ Kopien
- ³⁰RNA Muster-1: Verhältnis (E6*/qE6*II) vs. (E1^E4/qE1^E4), Cut-off: 1,5 (Werte oberhalb des Cut-offs sind rot)
- ³¹RNA Muster-2: Verhältnis (E1C/qE1C) vs. (L1/qL1), Cut-off: 0,0003 (Werte oberhalb des Cut-offs sind rot).
- ³²IHC-Ergebnisse: 0, Verlust des Proteins; 1, niedriges Expressionslevel; 2, hohes Expressionslevel
Hintergrund MFI Werte wurden von allen hier gezeigten MFI Werten subtrahiert; na, nicht analysiert.

10 LITERATURVERZEICHNIS

1. Schwartz SM, Daling JR, Doody DR, *et al.* Oral cancer risk in relation to sexual history and evidence of human papillomavirus infection. *Journal of the National Cancer Institute* 1998;90(21):1626-36.
2. Winer RL, Lee SK, Hughes JP, Adam DE, Kiviat NB, Koutsky LA. Genital human papillomavirus infection: incidence and risk factors in a cohort of female university students. *American journal of epidemiology* 2003;157(3):218-26.
3. zur Hausen H. Papillomaviruses and cancer: from basic studies to clinical application. *Nature reviews* 2002;2(5):342-50.
4. Lowy DR, Schiller JT. Prophylactic human papillomavirus vaccines. *The Journal of clinical investigation* 2006;116(5):1167-73.
5. Walboomers JM, Jacobs MV, Manos MM, *et al.* Human papillomavirus is a necessary cause of invasive cervical cancer worldwide. *The Journal of pathology* 1999;189(1):12-9.
6. Boshart M, Gissmann L, Ikenberg H, Kleinheinz A, Scheurlen W, zur Hausen H. A new type of papillomavirus DNA, its presence in genital cancer biopsies and in cell lines derived from cervical cancer. *The EMBO journal* 1984;3(5):1151-7.
7. Schwarz E, Freese UK, Gissmann L, *et al.* Structure and transcription of human papillomavirus sequences in cervical carcinoma cells. *Nature* 1985;314(6006):111-4.
8. Yee C, Krishnan-Hewlett I, Baker CC, Schlegel R, Howley PM. Presence and expression of human papillomavirus sequences in human cervical carcinoma cell lines. *The American journal of pathology* 1985;119(3):361-6.
9. Pai SI, Westra WH. Molecular pathology of head and neck cancer: implications for diagnosis, prognosis, and treatment. *Annual review of pathology* 2009;4:49-70.
10. Lie AK, Kristensen G. Human papillomavirus E6/E7 mRNA testing as a predictive marker for cervical carcinoma. *Expert review of molecular diagnostics* 2008;8(4):405-15.
11. Frattini MG, Laimins LA. Binding of the human papillomavirus E1 origin-recognition protein is regulated through complex formation with the E2 enhancer-binding protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1994;91(26):12398-402.
12. Wilson VG, West M, Woytek K, Rangasamy D. Papillomavirus E1 proteins: form, function, and features. *Virus genes* 2002;24(3):275-90.
13. Desaintes C, Demeret C. Control of papillomavirus DNA replication and transcription. *Seminars in cancer biology* 1996;7(6):339-47.
14. Steger G, Corbach S. Dose-dependent regulation of the early promoter of human papillomavirus type 18 by the viral E2 protein. *Journal of virology* 1997;71(1):50-8.
15. Roberts S, Ashmole I, Gibson LJ, Rookes SM, Barton GJ, Gallimore PH. Mutational analysis of human papillomavirus E4 proteins: identification of structural features important in

the formation of cytoplasmic E4/cytokeratin networks in epithelial cells. *Journal of virology* 1994;68(10):6432-45.

16. Roberts S, Ashmole I, Rookes SM, Gallimore PH. Mutational analysis of the human papillomavirus type 16 E1--E4 protein shows that the C terminus is dispensable for keratin cytoskeleton association but is involved in inducing disruption of the keratin filaments. *Journal of virology* 1997;71(5):3554-62.

17. DiMaio D, Lai CC, Mattoon D. The platelet-derived growth factor beta receptor as a target of the bovine papillomavirus E5 protein. *Cytokine & growth factor reviews* 2000;11(4):283-93.

18. Kiselev FL, Kiseleva NP, Kobzeva VK, *et al.* [Status of the human DNA papillomavirus in cervical tumors]. *Molekuliarnaia biologiya* 2001;35(3):470-6.

19. Huibregtse JM, Scheffner M, Howley PM. Localization of the E6-AP regions that direct human papillomavirus E6 binding, association with p53, and ubiquitination of associated proteins. *Molecular and cellular biology* 1993;13(8):4918-27.

20. Scheffner M, Werness BA, Huibregtse JM, Levine AJ, Howley PM. The E6 oncoprotein encoded by human papillomavirus types 16 and 18 promotes the degradation of p53. *Cell* 1990;63(6):1129-36.

21. Patel D, Huang SM, Baglia LA, McCance DJ. The E6 protein of human papillomavirus type 16 binds to and inhibits co-activation by CBP and p300. *The EMBO journal* 1999;18(18):5061-72.

22. Zimmermann H, Degenkolbe R, Bernard HU, O'Connor MJ. The human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein can down-regulate p53 activity by targeting the transcriptional coactivator CBP/p300. *Journal of virology* 1999;73(8):6209-19.

23. Gross-Mesilaty S, Reinstein E, Bercovich B, *et al.* Basal and human papillomavirus E6 oncoprotein-induced degradation of Myc proteins by the ubiquitin pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1998;95(14):8058-63.

24. Gewin L, Galloway DA. E box-dependent activation of telomerase by human papillomavirus type 16 E6 does not require induction of c-myc. *Journal of virology* 2001;75(15):7198-201.

25. Klingelhutz AJ, Foster SA, McDougall JK. Telomerase activation by the E6 gene product of human papillomavirus type 16. *Nature* 1996;380(6569):79-82.

26. Oh ST, Kyo S, Laimins LA. Telomerase activation by human papillomavirus type 16 E6 protein: induction of human telomerase reverse transcriptase expression through Myc and GC-rich Sp1 binding sites. *Journal of virology* 2001;75(12):5559-66.

27. Veldman T, Horikawa I, Barrett JC, Schlegel R. Transcriptional activation of the telomerase hTERT gene by human papillomavirus type 16 E6 oncoprotein. *Journal of virology* 2001;75(9):4467-72.

28. Dyson N, Howley PM, Munger K, Harlow E. The human papilloma virus-16 E7 oncoprotein is able to bind to the retinoblastoma gene product. *Science* 1989;243(4893):934-7.

29. Munger K, Werness BA, Dyson N, Phelps WC, Harlow E, Howley PM. Complex formation of human papillomavirus E7 proteins with the retinoblastoma tumor suppressor gene product. *The EMBO journal* 1989;8(13):4099-105.
30. Munger K, Basile JR, Duensing S, *et al.* Biological activities and molecular targets of the human papillomavirus E7 oncoprotein. *Oncogene* 2001;20(54):7888-98.
31. Funk JO, Waga S, Harry JB, Espling E, Stillman B, Galloway DA. Inhibition of CDK activity and PCNA-dependent DNA replication by p21 is blocked by interaction with the HPV-16 E7 oncoprotein. *Genes & development* 1997;11(16):2090-100.
32. Jones DL, Alani RM, Munger K. The human papillomavirus E7 oncoprotein can uncouple cellular differentiation and proliferation in human keratinocytes by abrogating p21Cip1-mediated inhibition of cdk2. *Genes & development* 1997;11(16):2101-11.
33. Zerfass-Thome K, Zwerschke W, Mannhardt B, Tindle R, Botz JW, Jansen-Durr P. Inactivation of the cdk inhibitor p27KIP1 by the human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein. *Oncogene* 1996;13(11):2323-30.
34. Zerfass K, Schulze A, Spitkovsky D, Friedman V, Henglein B, Jansen-Durr P. Sequential activation of cyclin E and cyclin A gene expression by human papillomavirus type 16 E7 through sequences necessary for transformation. *Journal of virology* 1995;69(10):6389-99.
35. Duensing S, Duensing A, Crum CP, Munger K. Human papillomavirus type 16 E7 oncoprotein-induced abnormal centrosome synthesis is an early event in the evolving malignant phenotype. *Cancer research* 2001;61(6):2356-60.
36. Duensing S, Munger K. Centrosome abnormalities and genomic instability induced by human papillomavirus oncoproteins. *Progress in cell cycle research* 2003;5:383-91.
37. Zhou J, Sun XY, Louis K, Frazer IH. Interaction of human papillomavirus (HPV) type 16 capsid proteins with HPV DNA requires an intact L2 N-terminal sequence. *Journal of virology* 1994;68(2):619-25.
38. Olthof NC, Straetmans JM, Snoeck R, Ramaekers FC, Kremer B, Speel EJ. Next-generation treatment strategies for human papillomavirus-related head and neck squamous cell carcinoma: where do we go? *Reviews in medical virology*.
39. Schmitt M, Dalstein V, Waterboer T, Clavel C, Gissmann L, Pawlita M. Diagnosing cervical cancer and high-grade precursors by HPV16 transcription patterns. *Cancer research* 2010;70(1):249-56.
40. Schmitt M, Dalstein V, Waterboer T, Clavel C, Gissmann L, Pawlita M. The HPV16 transcriptome in cervical lesions of different grades. *Molecular and cellular probes* 2011;25(5-6):260-5.
41. Hafkamp HC, Manni JJ, Haesevoets A, *et al.* Marked differences in survival rate between smokers and nonsmokers with HPV 16-associated tonsillar carcinomas. *Int J Cancer* 2008;122(12):2656-64.
42. Mellin H, Dahlgren L, Munck-Wikland E, *et al.* Human papillomavirus type 16 is episomal and a high viral load may be correlated to better prognosis in tonsillar cancer. *Int J Cancer* 2002;102(2):152-8.

43. Wiest T, Schwarz E, Enders C, Flechtenmacher C, Bosch FX. Involvement of intact HPV16 E6/E7 gene expression in head and neck cancers with unaltered p53 status and perturbed pRb cell cycle control. *Oncogene* 2002;21(10):1510-7.
44. Gillison ML. Human papillomavirus-associated head and neck cancer is a distinct epidemiologic, clinical, and molecular entity. *Seminars in oncology* 2004;31(6):744-54.
45. Parkin DM, Pisani P, Ferlay J. Estimates of the worldwide incidence of 25 major cancers in 1990. *Int J Cancer* 1999;80(6):827-41.
46. St John MA, Abemayor E, Wong DT. Recent new approaches to the treatment of head and neck cancer. *Anti-cancer drugs* 2006;17(4):365-75.
47. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. GLOBOCAN 2008 v1.2, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 10 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2010. Available from: <http://globocan.iarc.fr>, accessed on day/month/year. 2008.
48. Hunter KD, Parkinson EK, Harrison PR. Profiling early head and neck cancer. *Nature reviews* 2005;5(2):127-35.
49. Parkin DM, Bray F. Chapter 2: The burden of HPV-related cancers. *Vaccine* 2006;24 Suppl 3:S3/11-25.
50. Husmann G, Kaatsch P, Katalinic A, *et al.* Krebs in Deutschland 2005/2006, Häufigkeiten und Trends; Eine gemeinsame Veröffentlichung des Robert Koch-Instituts und der Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister (GEKID) in Deutschland e. V. Robert Koch-Institut 2010;7. Ausgabe.
51. Auluck A, Hislop G, Bajdik C, Poh C, Zhang L, Rosin M. Trends in oropharyngeal and oral cavity cancer incidence of human papillomavirus (HPV)-related and HPV-unrelated sites in a multicultural population: the British Columbia experience. *Cancer*;116(11):2635-44.
52. Chaturvedi AK, Engels EA, Anderson WF, Gillison ML. Incidence trends for human papillomavirus-related and -unrelated oral squamous cell carcinomas in the United States. *J Clin Oncol* 2008;26(4):612-9.
53. Conway DI, Stockton DL, Warnakulasuriya KA, Ogden G, Macpherson LM. Incidence of oral and oropharyngeal cancer in United Kingdom (1990-1999) -- recent trends and regional variation. *Oral oncology* 2006;42(6):586-92.
54. Hammarstedt L, Lindquist D, Dahlstrand H, *et al.* Human papillomavirus as a risk factor for the increase in incidence of tonsillar cancer. *Int J Cancer* 2006;119(11):2620-3.
55. Blomberg M, Nielsen A, Munk C, Kjaer SK. Trends in head and neck cancer incidence in Denmark, 1978-2007: focus on human papillomavirus associated sites. *Int J Cancer*;129(3):733-41.
56. Braakhuis BJ, Visser O, Leemans CR. Oral and oropharyngeal cancer in The Netherlands between 1989 and 2006: Increasing incidence, but not in young adults. *Oral oncology* 2009;45(9):e85-9.

57. Hocking JS, Stein A, Conway EL, *et al.* Head and neck cancer in Australia between 1982 and 2005 show increasing incidence of potentially HPV-associated oropharyngeal cancers. *British journal of cancer*;104(5):886-91.
58. Human papillomaviruses. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans / World Health Organization, International Agency for Research on Cancer 1995;64:1-378.
59. Chang Y, Cheng SD, Tsai CH. Chromosomal integration of Epstein-Barr virus genomes in nasopharyngeal carcinoma cells. *Head & neck* 2002;24(2):143-50.
60. Andl T, Kahn T, Pfuhl A, *et al.* Etiological involvement of oncogenic human papillomavirus in tonsillar squamous cell carcinomas lacking retinoblastoma cell cycle control. *Cancer research* 1998;58(1):5-13.
61. Paz IB, Cook N, Odom-Maryon T, Xie Y, Wilczynski SP. Human papillomavirus (HPV) in head and neck cancer. An association of HPV 16 with squamous cell carcinoma of Waldeyer's tonsillar ring. *Cancer* 1997;79(3):595-604.
62. Steenbergen RD, Hermsen MA, Walboomers JM, *et al.* Integrated human papillomavirus type 16 and loss of heterozygosity at 11q22 and 18q21 in an oral carcinoma and its derivative cell line. *Cancer research* 1995;55(22):5465-71.
63. zur Hausen H. Papillomavirus infections--a major cause of human cancers. *Biochimica et biophysica acta* 1996;1288(2):F55-78.
64. Syrjanen K, Syrjanen S, Pyrhonen S. Human papilloma virus (HPV) antigens in lesions of laryngeal squamous cell carcinomas. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec* 1982;44(6):323-34.
65. Snijders PJ, Cromme FV, van den Brule AJ, *et al.* Prevalence and expression of human papillomavirus in tonsillar carcinomas, indicating a possible viral etiology. *Int J Cancer* 1992;51(6):845-50.
66. Ang KK, Harris J, Wheeler R, *et al.* Human papillomavirus and survival of patients with oropharyngeal cancer. *N Engl J Med* 2010;363(1):24-35.
67. Chung CH, Gillison ML. Human papillomavirus in head and neck cancer: its role in pathogenesis and clinical implications. *Clin Cancer Res* 2009;15(22):6758-62.
68. Gillison ML, Koch WM, Capone RB, *et al.* Evidence for a causal association between human papillomavirus and a subset of head and neck cancers. *Journal of the National Cancer Institute* 2000;92(9):709-20.
69. Klussmann JP, Weissenborn SJ, Wieland U, *et al.* Human papillomavirus-positive tonsillar carcinomas: a different tumor entity? *Med Microbiol Immunol* 2003;192(3):129-32.
70. Klussmann JP, Weissenborn SJ, Wieland U, *et al.* Prevalence, distribution, and viral load of human papillomavirus 16 DNA in tonsillar carcinomas. *Cancer* 2001;92(11):2875-84.
71. Lindel K, Beer KT, Laissue J, Greiner RH, Aebersold DM. Human papillomavirus positive squamous cell carcinoma of the oropharynx: a radiosensitive subgroup of head and neck carcinoma. *Cancer* 2001;92(4):805-13.

72. Ritchie JM, Smith EM, Summersgill KF, *et al.* Human papillomavirus infection as a prognostic factor in carcinomas of the oral cavity and oropharynx. *Int J Cancer* 2003;104(3):336-44.
73. Smith EM, Ritchie JM, Summersgill KF, *et al.* Age, sexual behavior and human papillomavirus infection in oral cavity and oropharyngeal cancers. *Int J Cancer* 2004;108(5):766-72.
74. Lindquist D, Romanitan M, Hammarstedt L, *et al.* Human papillomavirus is a favourable prognostic factor in tonsillar cancer and its oncogenic role is supported by the expression of E6 and E7. *Mol Oncol* 2007;1(3):350-5.
75. Gillison ML, D'Souza G, Westra W, *et al.* Distinct risk factor profiles for human papillomavirus type 16-positive and human papillomavirus type 16-negative head and neck cancers. *Journal of the National Cancer Institute* 2008;100(6):407-20.
76. Sturgis EM, Cinciripini PM. Trends in head and neck cancer incidence in relation to smoking prevalence: an emerging epidemic of human papillomavirus-associated cancers? *Cancer* 2007;110(7):1429-35.
77. D'Souza G, Agrawal Y, Halpern J, Bodison S, Gillison ML. Oral sexual behaviors associated with prevalent oral human papillomavirus infection. *J Infect Dis* 2009;199(9):1263-9.
78. Hafkamp HC, Speel EJ, Haesevoets A, *et al.* A subset of head and neck squamous cell carcinomas exhibits integration of HPV 16/18 DNA and overexpression of p16INK4A and p53 in the absence of mutations in p53 exons 5-8. *Int J Cancer* 2003;107(3):394-400.
79. Scholes AG, Liloglou T, Snijders PJ, *et al.* p53 mutations in relation to human papillomavirus type 16 infection in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Int J Cancer* 1997;71(5):796-9.
80. Braakhuis BJ, Snijders PJ, Keune WJ, *et al.* Genetic patterns in head and neck cancers that contain or lack transcriptionally active human papillomavirus. *Journal of the National Cancer Institute* 2004;96(13):998-1006.
81. Fakhry C, Westra WH, Li S, *et al.* Improved survival of patients with human papillomavirus-positive head and neck squamous cell carcinoma in a prospective clinical trial. *Journal of the National Cancer Institute* 2008;100(4):261-9.
82. Shi W, Kato H, Perez-Ordóñez B, *et al.* Comparative prognostic value of HPV16 E6 mRNA compared with in situ hybridization for human oropharyngeal squamous carcinoma. *J Clin Oncol* 2009;27(36):6213-21.
83. Weinberger PM, Yu Z, Haffty BG, *et al.* Molecular classification identifies a subset of human papillomavirus--associated oropharyngeal cancers with favorable prognosis. *J Clin Oncol* 2006;24(5):736-47.
84. Haraf DJ, Nodzenski E, Brachman D, *et al.* Human papilloma virus and p53 in head and neck cancer: clinical correlates and survival. *Clin Cancer Res* 1996;2(4):755-62.
85. Attner P, Du J, Nasman A, *et al.* The role of human papillomavirus in the increased incidence of base of tongue cancer. *Int J Cancer* 2010;126(12):2879-84.

86. Jung AC, Briolat J, Millon R, *et al.* Biological and clinical relevance of transcriptionally active human papillomavirus (HPV) infection in oropharynx squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 2010;126(8):1882-94.
87. van Houten VM, Snijders PJ, van den Brekel MW, *et al.* Biological evidence that human papillomaviruses are etiologically involved in a subgroup of head and neck squamous cell carcinomas. *Int J Cancer* 2001;93(2):232-5.
88. Jemal A, Siegel R, Ward E, *et al.* Cancer statistics, 2008. *CA: a cancer journal for clinicians* 2008;58(2):71-96.
89. Ringstrom E, Peters E, Hasegawa M, Posner M, Liu M, Kelsey KT. Human papillomavirus type 16 and squamous cell carcinoma of the head and neck. *Clin Cancer Res* 2002;8(10):3187-92.
90. Fallai C, Perrone F, Licitra L, *et al.* Oropharyngeal squamous cell carcinoma treated with radiotherapy or radiochemotherapy: prognostic role of TP53 and HPV status. *International journal of radiation oncology, biology, physics* 2009;75(4):1053-9.
91. Fischer CA, Zlobec I, Green E, *et al.* Is the improved prognosis of p16 positive oropharyngeal squamous cell carcinoma dependent of the treatment modality? *Int J Cancer*;126(5):1256-62.
92. Lassen P. The role of Human papillomavirus in head and neck cancer and the impact on radiotherapy outcome. *Radiother Oncol*;95(3):371-80.
93. Lassen P, Eriksen JG, Hamilton-Dutoit S, Tramm T, Alsner J, Overgaard J. Effect of HPV-associated p16INK4A expression on response to radiotherapy and survival in squamous cell carcinoma of the head and neck. *J Clin Oncol* 2009;27(12):1992-8.
94. Clinical practice guidelines in oncology – Head and Neck Cancers. <http://wwwnccnorg> [18-01-2011].
95. Meek DW. Tumour suppression by p53: a role for the DNA damage response? *Nature reviews* 2009;9(10):714-23.
96. Hatakeyama M, Weinberg RA. The role of RB in cell cycle control. *Progress in cell cycle research* 1995;1:9-19.
97. Dai M, Clifford GM, le Calvez F, *et al.* Human papillomavirus type 16 and TP53 mutation in oral cancer: matched analysis of the IARC multicenter study. *Cancer research* 2004;64(2):468-71.
98. Kumar B, Cordell KG, Lee JS, *et al.* EGFR, p16, HPV Titer, Bcl-xL and p53, sex, and smoking as indicators of response to therapy and survival in oropharyngeal cancer. *J Clin Oncol* 2008;26(19):3128-37.
99. Licitra L, Perrone F, Bossi P, *et al.* High-risk human papillomavirus affects prognosis in patients with surgically treated oropharyngeal squamous cell carcinoma. *J Clin Oncol* 2006;24(36):5630-6.
100. Smeets SJ, Braakhuis BJ, Abbas S, *et al.* Genome-wide DNA copy number alterations in head and neck squamous cell carcinomas with or without oncogene-expressing human papillomavirus. *Oncogene* 2006;25(17):2558-64.

101. Bosch FX, Ritter D, Enders C, *et al.* Head and neck tumor sites differ in prevalence and spectrum of p53 alterations but these have limited prognostic value. *Int J Cancer* 2004;111(4):530-8.
102. Dyson N, Guida P, Munger K, Harlow E. Homologous sequences in adenovirus E1A and human papillomavirus E7 proteins mediate interaction with the same set of cellular proteins. *Journal of virology* 1992;66(12):6893-902.
103. Weinberg RA. The molecular basis of oncogenes and tumor suppressor genes. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1995;758:331-8.
104. Weinberg RA. The retinoblastoma protein and cell cycle control. *Cell* 1995;81(3):323-30.
105. Todd R, Hinds PW, Munger K, *et al.* Cell cycle dysregulation in oral cancer. *Crit Rev Oral Biol Med* 2002;13(1):51-61.
106. Karsai S, Abel U, Roesch-Ely M, *et al.* Comparison of p16(INK4a) expression with p53 alterations in head and neck cancer by tissue microarray analysis. *The Journal of pathology* 2007;211(3):314-22.
107. Leemans CR, Braakhuis BJ, Brakenhoff RH. The molecular biology of head and neck cancer. *Nature reviews*;11(1):9-22.
108. Sicinski P, Donaher JL, Parker SB, *et al.* Cyclin D1 provides a link between development and oncogenesis in the retina and breast. *Cell* 1995;82(4):621-30.
109. Hinds PW, Dowdy SF, Eaton EN, Arnold A, Weinberg RA. Function of a human cyclin gene as an oncogene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 1994;91(2):709-13.
110. Sherr CJ. Growth factor-regulated G1 cyclins. *Stem cells (Dayton, Ohio)* 1994;12 Suppl 1:47-55; discussion -7.
111. Begum S, Cao D, Gillison M, Zahurak M, Westra WH. Tissue distribution of human papillomavirus 16 DNA integration in patients with tonsillar carcinoma. *Clin Cancer Res* 2005;11(16):5694-9.
112. Hoffmann M, Ihloff AS, Gorogh T, *et al.* p16(INK4a) overexpression predicts translational active human papillomavirus infection in tonsillar cancer. *Int J Cancer* 2010;127(7):1595-602.
113. Rischin D, Young RJ, Fisher R, *et al.* Prognostic significance of p16INK4A and human papillomavirus in patients with oropharyngeal cancer treated on TROG 02.02 phase III trial. *J Clin Oncol* 2010;28(27):4142-8.
114. Smeets SJ, Hesselink AT, Speel EJ, *et al.* A novel algorithm for reliable detection of human papillomavirus in paraffin embedded head and neck cancer specimen. *Int J Cancer* 2007;121(11):2465-72.
115. Smith EM, Wang D, Kim Y, *et al.* P16INK4a expression, human papillomavirus, and survival in head and neck cancer. *Oral oncology* 2008;44(2):133-42.

116. Hoffmann M, Henry H, Tribius S, *et al.* HPV DNA, E6*I-mRNA expression and p16^{INK4a} immunohistochemistry in head and neck cancer – how valid is p16^{INK4a} as surrogate marker? Submitted 2011.
117. Psyrri A, DiMaio D. Human papillomavirus in cervical and head-and-neck cancer. *Nature clinical practice* 2008;5(1):24-31.
118. Rotnaglova E, Tachezy R, Salakova M, *et al.* HPV involvement in tonsillar cancer: Prognostic significance and clinically relevant markers. *Int J Cancer* 2010.
119. Weinberger PM, Merkley MA, Khichi SS, *et al.* Human papillomavirus-active head and neck cancer and ethnic health disparities. *The Laryngoscope*;120(8):1531-7.
120. Begum S, Gillison ML, Ansari-Lari MA, Shah K, Westra WH. Detection of human papillomavirus in cervical lymph nodes: a highly effective strategy for localizing site of tumor origin. *Clin Cancer Res* 2003;9(17):6469-75.
121. Klussmann JP, Gultekin E, Weissenborn SJ, *et al.* Expression of p16 protein identifies a distinct entity of tonsillar carcinomas associated with human papillomavirus. *The American journal of pathology* 2003;162(3):747-53.
122. Psyrri A, Gouveris P, Vermorken JB. Human papillomavirus-related head and neck tumors: clinical and research implication. *Current opinion in oncology* 2009;21(3):201-5.
123. Schmitt M, Bravo IG, Snijders PJ, Gissmann L, Pawlita M, Waterboer T. Bead-based multiplex genotyping of human papillomaviruses. *J Clin Microbiol* 2006;44(2):504-12.
124. Schmitt M, Dondog B, Waterboer T, Pawlita M. Homogeneous amplification of genital human alpha papillomaviruses by PCR using novel broad-spectrum GP5+ and GP6+ primers. *J Clin Microbiol* 2008;46(3):1050-9.
125. Hopman AH, Ramaekers FC. Processing and Staining of Cell and Tissue Material for Interphase Cytogenetics. John Wiley, New York 1998:8.5.1 - 8.5.22
126. Korn EL. Censoring distributions as a measure of follow-up in survival analysis. *Stat Med* 1986;5(3):255-60.
127. Grambsch P, Therneau T. Proportional hazards tests and diagnostics based on weighted residuals. *Biometrika* 1994(81):515-26.
128. Schoenfeld D. Residuals for the proportional hazards regression model. *Biometrika* 1982(69(1)):239-41.
129. Schmitt M, Dondog B, Waterboer T, Pawlita M, Tommasino M, Gheit T. Abundance of multiple high-risk human papillomavirus (HPV) infections found in cervical cells analyzed by use of an ultrasensitive HPV genotyping assay. *J Clin Microbiol* 2010;48(1):143-9.
130. Schmitt M. Detection of Nucleic Acids from Human Alpha Papillomaviruses in the Uterine Cervix. Dissertation submitted to the Combined Faculties for the Natural Sciences and for Mathematics of the Ruperto-Carola University of Heidelberg, Germany for the degree of Doctor of Natural Sciences 2008.
131. D'Souza G, Kreimer AR, Viscidi R, *et al.* Case-control study of human papillomavirus and oropharyngeal cancer. *N Engl J Med* 2007;356(19):1944-56.

132. Singhi AD, Westra WH. Comparison of human papillomavirus in situ hybridization and p16 immunohistochemistry in the detection of human papillomavirus-associated head and neck cancer based on a prospective clinical experience. *Cancer*;116(9):2166-73.
133. Soder AI, Hopman AH, Ramaekers FC, Conradt C, Bosch FX. Distinct nonrandom patterns of chromosomal aberrations in the progression of squamous cell carcinomas of the head and neck. *Cancer research* 1995;55(21):5030-7.
134. Allen CT, Lewis JS, Jr., El-Mofty SK, Haughey BH, Nussenbaum B. Human papillomavirus and oropharynx cancer: biology, detection and clinical implications. *The Laryngoscope*;120(9):1756-72.
135. Hopman AH, Kamps MA, Smedts F, Speel EJ, Herrington CS, Ramaekers FC. HPV in situ hybridization: impact of different protocols on the detection of integrated HPV. *Int J Cancer* 2005;115(3):419-28.
136. Hopman AH, Smedts F, Dignef W, *et al.* Transition of high-grade cervical intraepithelial neoplasia to micro-invasive carcinoma is characterized by integration of HPV 16/18 and numerical chromosome abnormalities. *The Journal of pathology* 2004;202(1):23-33.
137. Hopman AH, Theelen W, Hommelberg PP, *et al.* Genomic integration of oncogenic HPV and gain of the human telomerase gene TERC at 3q26 are strongly associated events in the progression of uterine cervical dysplasia to invasive cancer. *The Journal of pathology* 2006;210(4):412-9.
138. Poljak M, Kocjan BJ. Commercially available assays for multiplex detection of alpha human papillomaviruses. *Expert review of anti-infective therapy*;8(10):1139-62.
139. Wilczynski SP, Lin BT, Xie Y, Paz IB. Detection of human papillomavirus DNA and oncoprotein overexpression are associated with distinct morphological patterns of tonsillar squamous cell carcinoma. *The American journal of pathology* 1998;152(1):145-56.
140. Herrero R, Castellsague X, Pawlita M, *et al.* Human papillomavirus and oral cancer: the International Agency for Research on Cancer multicenter study. *Journal of the National Cancer Institute* 2003;95(23):1772-83.
141. Kreimer AR, Clifford GM, Boyle P, Franceschi S. Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005;14(2):467-75.
142. Chen R, Aaltonen LM, Vaheri A. Human papillomavirus type 16 in head and neck carcinogenesis. *Reviews in medical virology* 2005;15(6):351-63.
143. Pintos J, Black MJ, Sadeghi N, *et al.* Human papillomavirus infection and oral cancer: a case-control study in Montreal, Canada. *Oral oncology* 2008;44(3):242-50.
144. Schmitt M, Pawlita M. The HPV transcriptome in HPV16 positive cell lines. *Molecular and cellular probes* 2011;25(2-3):108-13.
145. Vinokurova S, Wentzensen N, Kraus I, *et al.* Type-dependent integration frequency of human papillomavirus genomes in cervical lesions. *Cancer research* 2008;68(1):307-13.

-
146. Reimers N, Kasper HU, Weissenborn SJ, *et al.* Combined analysis of HPV-DNA, p16 and EGFR expression to predict prognosis in oropharyngeal cancer. *Int J Cancer* 2007;120(8):1731-8.
147. Nasman A, Attner P, Hammarstedt L, *et al.* Incidence of human papillomavirus (HPV) positive tonsillar carcinoma in Stockholm, Sweden: an epidemic of viral-induced carcinoma? *Int J Cancer* 2009;125(2):362-6.
148. Adelstein DJ, Ridge JA, Gillison ML, *et al.* Head and neck squamous cell cancer and the human papillomavirus: summary of a National Cancer Institute State of the Science Meeting, November 9-10, 2008, Washington, D.C. *Head & neck* 2009;31(11):1393-422.
149. (TFI) WTI. WHO Report on the Global Tobacco Epidemic; Appendix VII – Table Age-standardized prevalence estimates for smoking, 2006. 2009.
150. Ernster JA, Sciotto CG, O'Brien MM, *et al.* Rising incidence of oropharyngeal cancer and the role of oncogenic human papilloma virus. *The Laryngoscope* 2007;117(12):2115-28.
151. Termine N, Panzarella V, Falaschini S, *et al.* HPV in oral squamous cell carcinoma vs head and neck squamous cell carcinoma biopsies: a meta-analysis (1988-2007). *Ann Oncol* 2008;19(10):1681-90.
152. Nuovo GJ. In situ detection of human papillomavirus DNA after PCR-amplification. *Methods in molecular biology* (Clifton, NJ;688:35-46.
153. Hafkamp HC, Mooren JJ, Claessen SM, *et al.* P21 Cip1/WAF1 expression is strongly associated with HPV-positive tonsillar carcinoma and a favorable prognosis. *Mod Pathol* 2009;22(5):686-98.
154. Chau NG, Perez-Ordóñez B, Zhang K, *et al.* The association between EGFR variant III, HPV, p16, c-MET, EGFR gene copy number and response to EGFR inhibitors in patients with recurrent or metastatic squamous cell carcinoma of the head and neck. *Head Neck Oncol* 2011;3:11.
155. Halec G, Schmitt M, Dondog B, *et al.* Biological Activity of Established and Possible/Probable High Risk Human Papillomavirus Types in Cervical Cancer Submitted 2011.
156. Gruttgen A, Reichenzeller M, Junger M, Schlien S, Affolter A, Bosch FX. Detailed gene expression analysis but not microsatellite marker analysis of 9p21 reveals differential defects in the INK4a gene locus in the majority of head and neck cancers. *The Journal of pathology* 2001;194(3):311-7.
157. Kamijo T, Zindy F, Roussel MF, *et al.* Tumor suppression at the mouse INK4a locus mediated by the alternative reading frame product p19ARF. *Cell* 1997;91(5):649-59.
158. Krimpenfort P, Quon KC, Mooi WJ, Loonstra A, Berns A. Loss of p16Ink4a confers susceptibility to metastatic melanoma in mice. *Nature* 2001;413(6851):83-6.
159. Bova RJ, Quinn DI, Nankervis JS, *et al.* Cyclin D1 and p16INK4A expression predict reduced survival in carcinoma of the anterior tongue. *Clin Cancer Res* 1999;5(10):2810-9.
160. Weinberger PM, Yu Z, Haffty BG, *et al.* Prognostic significance of p16 protein levels in oropharyngeal squamous cell cancer. *Clin Cancer Res* 2004;10(17):5684-91.

161. Namazie A, Alavi S, Olopade OI, *et al.* Cyclin D1 amplification and p16(MTS1/CDK4I) deletion correlate with poor prognosis in head and neck tumors. *The Laryngoscope* 2002;112(3):472-81.
162. Geisler SA, Olshan AF, Weissler MC, *et al.* p16 and p53 Protein expression as prognostic indicators of survival and disease recurrence from head and neck cancer. *Clin Cancer Res* 2002;8(11):3445-53.
163. Yuen PW, Man M, Lam KY, Kwong YL. Clinicopathological significance of p16 gene expression in the surgical treatment of head and neck squamous cell carcinomas. *Journal of clinical pathology* 2002;55(1):58-60.
164. Young R, Rischin D, Fisher R, *et al.* Relationship Between Epidermal Growth Factor Receptor Status, p16INK4A and Outcome in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2011.
165. Snow AN, Laudadio J. Human papillomavirus detection in head and neck squamous cell carcinomas. *Advances in anatomic pathology*;17(6):394-403.
166. Boyer SN, Wazer DE, Band V. E7 protein of human papilloma virus-16 induces degradation of retinoblastoma protein through the ubiquitin-proteasome pathway. *Cancer research* 1996;56(20):4620-4.
167. Chung YL, Lee MY, Horng CF, *et al.* Use of combined molecular biomarkers for prediction of clinical outcomes in locally advanced tonsillar cancers treated with chemoradiotherapy alone. *Head & neck* 2009;31(1):9-20.
168. Hong AM, Dobbins TA, Lee CS, *et al.* Use of cyclin D1 in conjunction with human papillomavirus status to predict outcome in oropharyngeal cancer. *Int J Cancer*;128(7):1532-45.
169. Li W, Thompson CH, Cossart YE, *et al.* The expression of key cell cycle markers and presence of human papillomavirus in squamous cell carcinoma of the tonsil. *Head & neck* 2004;26(1):1-9.
170. Li W, Thompson CH, O'Brien CJ, *et al.* Human papillomavirus positivity predicts favourable outcome for squamous carcinoma of the tonsil. *Int J Cancer* 2003;106(4):553-8.
171. Kotelnikov VM, Coon JSt, Mundle S, *et al.* Cyclin D1 expression in squamous cell carcinomas of the head and neck and in oral mucosa in relation to proliferation and apoptosis. *Clin Cancer Res* 1997;3(1):95-101.
172. Haas S, Hormann K, Bosch FX. Expression of cell cycle proteins in head and neck cancer correlates with tumor site rather than tobacco use. *Oral oncology* 2002;38(6):618-23.
173. Takes RP, Baatenburg de Jong RJ, Schuurin E, Litvinov SV, Hermans J, Van Krieken JH. Differences in expression of oncogenes and tumor suppressor genes in different sites of head and neck squamous cell. *Anticancer research* 1998;18(6B):4793-800.
174. Williams ME, Gaffey MJ, Weiss LM, Wilczynski SP, Schuurin E, Levine PA. Chromosome 11Q13 amplification in head and neck squamous cell carcinoma. *Archives of otolaryngology--head & neck surgery* 1993;119(11):1238-43.

175. Sherr CJ, Roberts JM. CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. *Genes & development* 1999;13(12):1501-12.
176. Ahomadegbe JC, Barrois M, Fogel S, *et al.* High incidence of p53 alterations (mutation, deletion, overexpression) in head and neck primary tumors and metastases; absence of correlation with clinical outcome. Frequent protein overexpression in normal epithelium and in early non-invasive lesions. *Oncogene* 1995;10(6):1217-27.
177. Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, Harris CC. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer research* 1994;54(18):4855-78.
178. Butz K, Shahabeddin L, Geisen C, Spitkovsky D, Ullmann A, Hoppe-Seyler F. Functional p53 protein in human papillomavirus-positive cancer cells. *Oncogene* 1995;10(5):927-36.
179. Smith EM, Wang D, Rubenstein LM, Morris WA, Turek LP, Haugen TH. Association between p53 and human papillomavirus in head and neck cancer survival. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008;17(2):421-7.
180. Riethdorf S, Friedrich RE, Ostwald C, *et al.* p53 gene mutations and HPV infection in primary head and neck squamous cell carcinomas do not correlate with overall survival: a long-term follow-up study. *J Oral Pathol Med* 1997;26(7):315-21.
181. Suzuki H, Tomida A, Tsuruo T. Dephosphorylated hypoxia-inducible factor 1alpha as a mediator of p53-dependent apoptosis during hypoxia. *Oncogene* 2001;20(41):5779-88.
182. Marchetti A, Buttitta F, Pellegrini S, *et al.* mdm2 gene amplification and overexpression in non-small cell lung carcinomas with accumulation of the p53 protein in the absence of p53 gene mutations. *Diagn Mol Pathol* 1995;4(2):93-7.